KU/CH PCT/CH 03 / 00666

2 0. Feb. 7

(20, 02, 2004



Europäisches Patentamt

European **Patent Office** Office européen des brevets

PCT

Bescheinigung

Certificate

WIPO Attestation

REC'D 0 1 MAR 2004

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmel-

dung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application conformes à la version described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patent application No. Demande de brevet n° Patentanmeldung Nr.

02022869.8

PRIORITY DOCUMENT SUBMITTED OR TRANSMITTED IN **COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**

> Der Präsident des Europäischen Patentamts; Im Auftrag

For the President of the European Patent Office Le Président de l'Office européen des brevets p.o.

BEST AVAILABLE COPY R C van Dijk



Europea Patent C Office européen des brevets



Anmeldung Nr:

Application no.: 02022869.8

Demande no:

Anmeldetag:

Date of filing:

14.10.02

Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Cardion AG Max-Planck-Strasse 15a 40699 Erkrath ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention: (Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung. If no title is shown please refer to the description. Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Interleukin-15 Antagonisten und ihre Verwendung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunerkrankungen

In Anspruch genommene Prioriät(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s) revendiquée(s) Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/Classification internationale des brevets:

C07K16/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR

-1-

Cardion AG

14. Oktober 2002 2002CAR004EP

Interleukin-15 Antagonisten und ihre Verwendung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge- und/oder Autoimmunerkrankungen

5

10

15

Die Erfindung betrifft Fusionsproteine aus einem Wildtyp-IL-15 und einem IgG-Fc-Fragment sowie ihre Herstellung und Verwendung zur Inhibierung von Immunreaktionen und zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolge-und/oder Autoimmunerkrankungen.

Rine effektive Immunantwort wird durch die Aktivierung von T-Zellen des Immunsystems, die durch ein Antigen oder Mitogen ausgelöst wird, eingeleitet. Die Aktivierung der T-Zellen erfordert zahlreiche zelluläre Veränderungen, hierzu gehören z.B. die Expression von Cytokinen und deren Rezeptoren. Zu diesen Cytokinen gehören unter anderem IL-15 und IL-2.

IL-15 und IL-2 sind bekannte Wachstumsfaktoren, die eine signifikante Rolle spielen in der Proliferation und Differenzierung von humanen und murinen T-Zellen, Makrophagen, natürlichen Killer (NK)-Zellen, cytotoxischen T-Zellen (CTL), Lymphozyt-aktivierten Killer (LAK)-Zellen sowie in der Kostimulation von B-Zellen, die beispielsweise durch anti-Immunoglobulin (anti-IgM) oder Phorbolester aktiviert worden sind. Die Proliferation dieser Zellen verstärkt die Immunantwort eines Organismus.

25

20

IL-15 wurde erstmals als ein sekretorisches Cytokin beschrieben, das die Proliferation von IL-2 abhängigen murinen cytotoxischen T-Zellen (CTLL-2) induziert. IL-15 wurde als ein 162 Aminosäuren langes Vorläuferprotein mit einer Leader-

15

Sequenz von 48 Aminosäuren, also einem reifen Protein von 114 Aminosäuren Länge, charakterisiert (Grabstein et al., (1994) Science 264(5161):965-8).

IL-15 wird in Epithel- und Fibroblast-Zelllinien sowie Monocyten des peripheren Blutes gebildet. Seine spezifische mRNA wurde ebenfalls in Plazenta, Skelettmuskeln und Nieren gefunden (Grabstein et al., supra)

Neben den gemeinsamen biologischen Eigenschaften, besitzen IL-15 und IL-2 ebenfalls homologe Strukturen. Beide Molektile binden an mindestens drei getrennte Rezeptor-Untereinheiten auf der Membran von T-Zellen, wobei der betaund der gamma-Untereinheit-Komplex über den die Signaltransduktion erfolgt derselbe ist, während die alpha-Untereinheit spezifisch für die Bindung von IL-15 bzw. IL-2 ist. Es konnte festgestellt werden, dass gegen die alpha-Untereinheit des IL-2 Rezeptors gerichtete Antikörper keinen Effekt auf die IL-15 Bindung an seine spezifische alpha-Untereinheit ausüben (Grabstein et al., supra), wohingegen Antikörper, die gegen die beta-Untereinheit des IL-2 Rezeptors gerichtet waren, die Aktivität von IL-15 blockieren (Giri et al., (1994) EMBO I., 13:2822). Über die beta- und gamma-Untereinheiten von IL-15 erfolgt die Signaltransduktion.

20 Bei zahlreichen Krankheiten ist es aus therapeutischen Gründen erforderlich, eine Antwort des Immunsystems des Patients zu supprimieren. Hierzu gehören beispielsweise Autoimmunkrankheiten, insbesondere Diabetes mellitus Typ I (Bottazzo, G. F., et al., (1985) N Engl J Med 113:353), rheumatische Arthritis, Multiple Sklerose, chronische Lebererkrankungen, entzündliche Darmerkrankungen, Transplantat-anti-Wirt-Krankheit (graft-versus-host disease [GVHD]) und Transplantat-Abstoßung (Sakai et al., (1998) Gastrocnterology, 114(6):1237-1243; Kivisakk et al., (1998) Clin Exp Immunol, 111(1):193197).

Werden immunkompetente Zellen von einem genetisch nicht identischen Orga-30 nismus übertragen, so kommt es zur Reaktion dieser Zellen gegen den Empfän-

25

30

-3-

gerorganismus (GVHD) (Janeway C.A. u. Travers P., Spektrum-Verlag, deutsche Auflage 1995 S. 467).

Für viele lebensbedrohende Krankheiten ist die Transplantation von Organen oder Geweben zur Standardmethode und in zahlreichen Fällen zur einzig lebensrettenden Behandlung geworden. Schwierigkeiten gibt es jedoch im Hinblick auf Abstoßungsreaktionen des Empfängerorganismus, die durch Immunantworten auf die fremden Zelloberflächen-Antigene des Transplantats hervorgerufen werden.

Bei einer Transplantation ist der Grad einer Transplantatabstoßung von dem Ausmaß der histogenetischen Differenz zwischen Spender und Empfänger (Histokompatibilität) abhängig. Unterschiede im Antigenmuster von Spender- und Empfängerorganismus rufen in letzterem eine Immunreaktion, resultierend in einer Abstoßungsreaktion, gegen das Transplantat hervor. Die Abstoßung eines Transplantates findet sowohl durch humorale als auch zelluläre Reaktionen statt. Humorale Effektoren sind Antikörper unterschiedlicher Spezifität, wie z.B. Antikörper-abhängige zellvermittelte Cytotoxität und Antikörper gegen Strukturen des Spender-HLA-Systems. Zeiluläre Effektoren stellen insbesondere cytotoxische T-Zeilen in Verbindung mit u.a. Makrophagen statt (Immunologie, Janeway C.A. u.

Ein Therapieansatz ist es, die humorale bzw. zelluläre Immunantwort durch Immunsuppressiva, insbesondere antagonistische IL-15 bzw. IL-2-Antikörper bzw. IL-15 bzw. IL-2 Antagonisten zu supprimieren. Weiterhin sind Antikörper gegen den IL-2-Rezeptor bereits zur Verhinderung der akuten Abstoßung bei Nierentransplantationen zugelassen (Novartis, Basel, Schweiz; Roche, Basel, Schweiz; Zenapax; Simulect).

Verschiedene Therapien unter Verwendung von Antikörpern gegen IL-15 bzw. IL-2 Moleküle sind beschrieben worden. So konnte beispielsweise die verlängerte Überlebensdauer eines allotransplantierten Primatenherzen durch die Verabrei-

-4-

chung des monoklonalen Antikörpers anti-IL-2R beta (Mik.beta-1) erreicht werden (Tinubu et al., (1994) J Immunol. 153:4330). Weiterhin wurde eine Blockierung der Transplantatabstoßung durch monoklonale Antikörper, die gegen das T-Zell spezifische Antigen CD3 gerichtet waren, beschrieben (Mackie et al., (1990) TransPlantation 49:1150).

Des weiteren sind zahlreiche IL-15 Antagonisten beschrieben worden, die das Bindungsverhalten von IL-15 an seinen Rezeptor verändern. Diese Antagonisten wurden durch Einführung von Mutation(en) in die Sequenz des Wildtyp-IL-15 erzielt. So wurde beispielsweise eine Mutation an der Aminosäureposition 56 (Aspartat) [Position 8 nach Abspalten der Leader-Sequenz] beschrieben, durch die zwar eine Bindung an die alpha-Untereinheit des IL-15 Rezeptors erfolgte, jedoch die Bindung an die bets-Untereinheit verhindert wurde (WO 96/26274). In einem anderen Ansatz wurde durch eine Mutation an der Aminosäureposition 156 (Glutamin) [Position 108 nach Abspalten der Leader-Sequenz] die Interaktion mit der gamma-Untereinheit inhibiert (WO 96/26274; WO 97/41232). Weiterhin wurde durch PEGyliertes IL-15 eine Bindung an die alpha-Untereinheit ermöglicht. Aus sterischen Gründen war jedoch eine Bindung an die beta-Untereinheit nicht mehr möglich (Pettit et al., (1997) J Biol Chem, 272 4: 2312-2318).

20

25

30.

15

5

Bei den beschriebenen IL-15 Antagonisten handelt es sich um mutierte IL-15 (mut-IL-15) Sequenzen, die entweder für sich oder als Fusionsprotein antagonistische Wirkungen erzielten. Derartige Fusionsproteine sind Polypeptide, bestehend aus einem N-terminalen mut-IL-15-Fragment und einem C-terminalen Fc-Pragment, insbesondere einem murinen IgG2a oder humanen IgG1 (WO 97/41232; Kim et al., (1998) J Immunol., 160:5742-5748).

Unter einem Pc (Fragment crystallizable) -Fragment ist das Fragment eines Antikörpers zu verstehen, das keine Antigene bindet. Die beiden weiteren identischen Fab (Fragmentantigen binding) -Fragmente eines Antikörpers haben antigenbin-

-5-

dende Aktivität (Immunologie, Janeway C.A. u. Travers P., Deutsche Auflage (1995), S. 117-8).

Nachteil dieser mutierten IL-15 Molektile ist jedoch, dass sie gegentiber dem Wildtyp-IL-15 eine veränderte Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen und dadurch abweichende Degradationspunkte aufweisen, so dass Degradationsprodukte auftreten, die in den Zellen natürlicherweise nicht vorkommen, und die toxische Wirkung in dem Organismus entfalten können. Art und Ausmaß derartiger und anderer Nebenwirkungen sind im Detail nicht absehbar.

10

20

25

Weiterer Nachteil ist, dass Patienten, die Transplantate in sich tragen, diese in der Regel Zeit ihres Lebens behalten, so dass sie lebenslang auf die Einnahme von Immunsupressiva angewiesen sind. Vor allem dadurch, dass nur unzureichende Erkenntnisse über die Nebenwirkungen der Langzeiteinnahme solcher Immunsupressiva vorliegen, besteht dringender Bedarf, diese Nebenwirkungen auszuschließen oder mindestens einzuschränken.

Nachgewiesen wurde bei der Verabreichung immunsuppressiver Komponenten, wie Cyclosporine A, FK506 und Rapamycin, dass diese Agenzien die Proliferation von T-Zellen insgesamt inhibieren (Penn, (1991) Transplant Proc, 23:1101; Beveridge et al., (1984) Lancet 1:788).

Ein großer Nachteil ist, dass die in der Regel systemische Verabreichung solcher Immunsuppressiva zur Verteilung derselben im gesamten Organismus führt und nicht die lokale Präsenz am Ort des/der transplantierten Zellen, Gewebes oder Organs gewährleistet. Die Inhibierung der T-Zellproliferation im gesamten Organismus kann jedoch Infektionen, toxische Abbauprodukte oder sogar Krebs hervorrufen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Immunsupressivum herzustellen, das keine bzw. kaum Nebenwirkungen in einem Organismus entfaltet, in welchem eine Immunantwort inhibiert werden soll.

Es ist bekaunt, dass mutierte IL-15 Moleküle oder Fusionsproteine, bestehend aus einem mut-IL-15 und einem Fc-Fragment eine antagonistische Wirkung auf IL-15 entfalten, indem sie das Rezeptorbindungsverhalten inhibieren oder verändern.

Völlig überraschend war allerdings, dass auch ein Fusionsprotein, bestehend aus einem N-terminalen Wildtyp-IL-15 und einem C-terminalen Fc-Fragment, insbesondere einem murinen IgG2a, ebenfalls eine antagonistische Wirkung entfaltet, obwohl an sich eine agonistische Wirkung zu erwarten wäre. Lediglich durch das Anfügen eines Fc-Fragments an ein natürlich vorkommendes, im Normalfall ein immunstimulierendes IL-15 Molekül konnte der Wirkmechanismus, umgekehrt werden, also die Inhibierung einer Immunantwort erreicht werden.

Uberraschend war diese Erkenntnis gerade deshalb, weil bei der Annahme einer natürlichen Faltung des Wildtyp-IL-15-Abschnitts des Fusionsproteins nicht davon auszugehen war, dass das Rezeptorbindungsverhalten allein durch das angefügte Fc-Fragment derart veränderbar ist, dass das gesamte Molekül Wildtyp-IL-15-Fc antagonistische Wirkung zum Wildtyp-IL-15 entfaltet.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Fusionsprotein aus einerseits einem Wildtyp-IL-15 und andererseits einem IgG-Fc-Fragment, mit Ausnahme eines murinen IgG2b-Fc-Fragments.

Unter einem Fusionsprotein gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Expressionsprodukt eines fusionierten Gens zu verstehen. Ein fusioniertes Gen entsteht aus der Verknüpfung zweier oder mehrerer Gene oder Genfragmente, wodurch eine neue Kombination entsteht.

15

20

25

30

-7-

Unter einem Wildtyp-IL-15 gemäß der vorliegenden Erfindung wird das natürlich vorkommende IL-15 verstanden, wie beispielsweise in Grabstein et al., (1994) Science 264(5161):965-8 beschrieben.

Unter einem Fc(Fragment crystallizable)-Fragment ist das Fragment eines Antikörpers zu verstehen, das keine Antigene bindet. Das Fc-Fragment kann aus natürlicher Quelle stammen, rekombinant hergestellt werden und/oder synthetisiert werden. Entsprechende Methoden sind dem Fachmann bekannt.

10 Bei dem Fc-Fragment des erfindungsgemäßen Pusionsproteins handelt es sich um ein ImmunglobulinG (IgG) und zwar um ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, vorzugsweise um ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere um ein IgG1. Vorzugsweise wurden die IgG's ab der Hinge-Region verwendet. Als Hinge-Region wird die flexible Region im Ig-Molekül bezeichnet.

Unter erfindungsgemäßen IgG's sind beispielsweise folgende beschriebene IgG's zu verstehen:

humanes IgG1 (Paterson, T. et al., (1998), Immunotechnology 4(1):37-47, murines IgG2a (Sikorav, J.L., (1980), Nuleic Acids Res. 8(14):3143-3155), murines IgG1 (French et al., (1991), J. Immunol. 146(6):2010-2016, humanes IgG2 (Krawinkel, U. und Rabbitts, T.H.., (1982), EMBO J. 1(4):403-407; Wang et al., (1980), J. Immunol. 125(3):1048-1054), murines IgG2b (Schlomchik, M.J., (1987), Nature 328, 805-811), humanes IgG3 (Huck, S. et al., (1986), Nucleic Acids Res. 14(4):1779-1789), murines IgG3 (Wels et al., (1984), EMBO J., 3(9):2041-2046) und humanes IgG4 (Pink et al., (1970), Biochem. J., 117(1):33-47) beschrieben worden.

Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Fusionsprotein ein chimäres Fusionsprotein, beispielsweise enthaltend ein Wildtyp-IL-15 und ein hetereologes IgG1-Fc-Fragment oder ein hetereologes IgG2a-Fc-Fragment.

In bevotzugten Ausführungsformen umfasst das erfindungsgemäße Fusionsprotein die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5.

S

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die für ein Pu-

20

25

sionsprotein kodiert, das einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein IgG-

Fc-Fragment, mit Ausnahme eines murinen IgG2b-Fc-Fragments, enthält.

Vorzugsweise kodiert die erfindungsgemäße Nukleinsäure für ein Wildtyp-II-15 und ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, besonders bevorzugt für ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, am bevorzugtesten für ein IgG1.

Bevorzugt kodiert die erfindungsgemäße Nukleinsäure ein Fusionsprotein mit einer der Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5.

In bevorzugten Ausführungsformen enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure die DNA-Sequenzen SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 oder SEQ ID NO:10.

Unter einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man eine RNA oder DNA, insbesondere genomische DNA, cDNA oder synthetische DNA, die beispielsweise auf Phosphoramidierungsebene synthetisiert wurde. Ebenfalls sind Kombinationen und/oder Modifikationen von Nukleotiden dieser Nukleinsäuren umfasst. Weiterhin umfasst dieser Begriff einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren.

30. Ebenso umfasst sind Nukleinsäuren, die funktionell verknüpfte Komponenten beinhalten, beispielsweise ein oder mehrere fusionierte Gene oder aktive Teile

-9-

davon kodierend für ein oder mehrere erfindungsgemäße Fusionsproteine sowie regulierbare Elemente und/oder regulative Nukleotidsequenzen, die die Expression des/der Gene mengenmäßig und/oder zeitabhängig beeinflussen.

Regulierbare Elemente sind beispielsweise Promotoren für die konstitutive oder zell- bzw. gewebsspezifische Expression.

Regulative Nukleotidsequenzen umfassen beispielsweise Leadersequenzen, Polyadenylierungssequenzen, z.B. ein SV40-Polyadenylierungssignal,

Enhancersequenzen, IRES-Sequenzen und Introns.

Bevorzugte Leadersequenzen der vorliegenden Erfindungen sind beispielsweise die nachfolgend aufgeführten:

15 Igk-Leader:

5-ATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCC AGGTTCCACTGGTGAC -3`,

CD5-Leader:

20 5'-ATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGTACCTGCTGGGGGATGCTGGTCGCTTCCTGCCTCGGA-3',

CD4-Leader:

5'-ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACT GGCGCTCCTCCCAGCAGCCACTCAGGGA-3',

IL-2-Leader:

5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACT TGTCACAAACAGT-3',

MCP-Leader:

5

20

5'-TGAAAGTCTCTGCCGCCCTTCTGTGCCTGCTGCTCATAGCAGCCACC
TTCATTCCCCAAGGGCTCGCT-3',

kurzer nativer IL-15-Leader:

5'-ATGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAA-3'

langer nativer IL-15-Leader:

Die Komponenten sind funktionell verknüpft, wenn sie derart verbunden sind, dass unter dem Einfluss der Transkriptionsregulation die Sequenz(en) der bzw. des enthaltenen Gene bzw. Gens transkribiert werden bzw. wird.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält.

Vektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung können Plasmide, Shuttle-Vektoren, Phagemide, Cosmide, adenovirale Vektoren, retrovirale Vektoren, Expressionsvektoren und gentherapeutisch wirksame Vektoren sein.

Expressionsvektoren im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, mindestens ein Translations-Initiations-Signal, ein Translations-Terminations-Signal und/oder ein Polyadenylisierungs-Signal zur Expression in Eukaryoten.

10

15

20

25

30

- 11 -

Kommerziell erhältliche Expressionsvektoren, insbesondere zur Expression in Säugetierzellen, beispielsweise pIRES (Fa. Clontech, Palo Alto, USA), pCI-neo Vektor (Fa. Promega, Madison, USA), pCMV-Script (Fa. Stratagene, La Jolla, USA) und pCDNA Vektor (Fa. Invitrogen, Paisley, UK), sind zum Einbau der erfindungsgemäßen NS geeignet.

Erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren sind zum Beispiel Virusvektoren, beispielsweise Adenovirus-Vektoren, retrovirale Vektoren oder Vektoren, die auf Replikons von RNA Viren beruhen (Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3: 466-76; Springer et al., 1998, Mol. Cell. 2: 549-58; Khromykh, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther.; 2: 555-69).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, dass man die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Fragmente mit Liposomen komplexiert. Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, dass eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den Lipidmischungen DOTMA (1,2-dioleyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (dioleoxylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Transfektionseffizienz bei verschiedenen Zelllinien getestet. (Behr et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986; Gao und Huang, 1991, Biochem. Biophys. Acta 1189, 195-203; Felgner et al. 1994, J. Biol, Chem. 269, 2550-2561). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-ammoniumethyl-sulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; diocta-decylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transport von Nukleinsäuren in die Zellen erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zell ermög4.4

10

15

20

25

: ji .

lichen, sein (Schwartz et al., 1999, Gene Therapy 6: 282; Branden et al. 1999, Nature Biotechs. 17: 784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Zytoplasma der Zelle ermöglichen (Planck et al., 1994, J. Biol; Chem. 269, 12918; Kichler et al., 1997, Bioconj. Chem. 8, 213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Pelmann, 1990, Chem. Rev. 90, 544).

Ein Gegenstand der Erfindung ist eine Zelle, die mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor enthält.

Bevorzugt handelt es sich bei dieser Zelle um eine Vorläuferzelle, eine immortalisierte Zelle oder eine Stammzelle, insbesondere eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle. Derartige pluripotente embryonale Stammzellen oder Zelllinien können aus der inneren Zellmasse von Blastozyten gewonnen werden (Robertson, Embryo-derived stem cell lines, in Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, Robertson, editor, IRL Press, Washington DC, 1987). Besonders bevorzugte Stammzellen, die aus adultem Gewebe stammen, umfassen z.B. neuronale Stammzellen, Stammzellen aus dem Knochenmark, mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, epitheliale Stammzellen, Stammzellen aus dem Verdauungstrakt und Duktus Stammzellen.

Erfindungsgemäße Zellen sind beispielsweise Epithelzellen, Gefäßzellen, Leberzellen, Herzzellen, Hautzellen, Muskelzellen, Nervenzellen, Knochmarkzellen, CHO-Zellen (Ovarzellen) und Zellen aus der Bauchspeicheldrüse, aus der Niere, aus dem Auge oder aus der Lunge.

Die erfindungsgemäße Zelle ist insbesondere eine Säugetierzelle, inklusive einer humanen Zelle. Diese Zelle kann beispielsweise aus einem Menschen, einer

- 13 -

Mans, einer Ratte, einem Meerschweinchen, einem Kaninchen, einer Kuh, einer Ziege, einem Schaf, einem Pferd, einem Schwein, einem Hund, einer Katze oder einem Affen, vorzugsweise aus einem Menschen, stammen.

5 Die erfindungsgemäßen Zellen können auch zur Expression eines heterologen : !
Gens verwendet werden.

Vorzugsweise liegt die erfindungsgemäße Zelle in Form einer Zelllinie vor. Eine erfindungsgemäße Zelllinie kann hergestellt werden durch Transfektion, Transformation oder Infektion einer Zelllinie mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder einem erfindungsgemäßen Vektor mit Hilfe von Methoden, die dem Fachmann geläufig sind, beispielsweise Transfektion, Transformation, Elektroporation, Mikroinjektion oder Infektion.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend mindestens ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein, mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor und/oder mindestens eine erfindungsgemäße Zelle und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

20

25

10

Geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, die beispielsweise der Stabilisierung oder Konservierung des Arzneimittels oder Diagnostikums dienen, sind dem Fachmann allgemein bekannt. Beispiele für solche Hilfs- und/oder Zusatzstoffe sind physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder inerte Gase.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann z.B. zur Prophylaxe, Therapie oder Diagnose von Erkrankungen dienen. Zu diesen Krankheiten gehören beispielsweise:

12:71

- 14 -

rheimistischen Erkrankungen, beispielsweise rheumatische Arthritis, Sjögren's Syndrom, Sklcroderma, Dermatomyositis, Polymyositis, Reiter's Syndrem joder Behoet's Krankheit.

Diabetes Typ I oder Typ II, ..

Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, beispielsweise Morbus Basedow 5 Krankheit, Hashimoto's Thyroiditis,

Antoimmunerkranungen des zentralen Nervensystems, beispielsweise Multiple Sklerose.

Hauterkrankungen, beispielsweise Psoriasis, Neurodermitis,

entzündliche Darmerkrankungen, beispielsweise Morbus Crohn, 10

Immunstörungserkrankungen, beispielsweise AIDS

Gefäßerkrankungen.

Transplantationsfolgeerkrankungen, beispielsweise Transplantatabstoßungsreaktionen und

15 Tumorerkrankungen.

20

25

Die Verabreichung des erfindungsgemäßen Arzneimittels erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen Methoden, beispielsweise intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intrakranial, intraorbital, intrakapsulär, intraspinal, transmuskulär, topikal oder oral. Weitere Methoden der Verabreichung sind beispielsweise die systemische oder lokale Injektion, die Perfusion oder die Katheterbasierte Verabreichung.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann beispielsweise in oralen Darreichungsform, wie z.B. Tabletten oder Kapseln, über die Mucous-Membran, z.B. die Nase oder die Mundhöble, in Form von Sprays in die Lunge oder in Form von Disposiunter die Haut implantiert, verabreicht werden. Trans-dermal- 15 -

therapeutische Systeme (TTS) sind z.B. aus EP 0 944 398-A1, EP 0 916 336-A1, EP 0 889-723-A1 oder EP 0 852 493-A1 bekannt.

Das Arzneimittel kann in den Organismus eingebracht werden entweder mit Hilfe eines ex vivo Ansatzes, bei dem die Zellen aus dem Patienten entfernt, genetisch modifiziert, beispielsweise durch DNA-Transfektion, und danach erneut in den Patienten eingeführt werden oder mit Hilfe eines in vivo Ansatzes, bei welchem erfindungsgemäße gentherapeutisch wirksame Vektoren in den Körper des Patienten eingebracht werden, als nackte DNA oder unter Verwendung von viralen oder nicht-viralen erfindungsgemäßen Vektoren oder erfindungsgemäßen Zellen.

Im Stand der Technik ist bekannt, dass die Dosierung von Arzneimitteln von mehreren Fakteren abhängt, beispielsweise von dem Körpergewicht, dem generellen Gesundheitszustand, dem Ausmaß der Körperoberfläche, dem Alter des Patients sowie der Wechselwirkung mit anderen Medikamenten. Eine Dosierung hängt ebenfalls ab von der Art der Verahreichung. Die Dosierung ist daher im Einzelfall für jeden Patienten vom Fachmann zu bestimmen. Die Verahreichung des Arzneimittels kann einmal oder mehrmals am Tag und über mehrere Tage hinweg erfolgen, auch dies ist vom Fachmann bestimmbar.

20

25

15

5

10

Ein weiteren Gegenstand der Erfindung betrifft ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder ein humanes oder tierisches Säugetierorgan, enthaltend mindestens ein Pusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens eine Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält.

10

20

25

. 30

lii

- 16 -

Bevorzugt enthält das Fusionsprotein des erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organispezifischen Gewebes und/oder des erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans einerseits ein Wildtyp-IL-15 und anderetseits ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein murines IgG2b, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, bevorzugt ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere ein IgG1, besonders bevorzugt kein murines IgG2b.

Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise Gewebe aus der Bauchspeicheldrüse, einschließlich beispielsweise der Langerhanschen Inselzellen, sowie Herz-, Herzmuskel-, Nieren-, Leber-, Lungen-, Milz-, Knorpel-, Bänder-, Retina-, Hornhaut-, Knochenmark-, Haut-, Nerven- und/oder Muskelgewebe sein.

Humane oder tierische Säugetierorgane der vorliegenden Erfindung können z.B. die Bauchspeicheldrüse, das Herz, die Bauchspeicheldrüse, die Niere, die Leber, die Lunge, die Milz, das Auge und/oder die Haut sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein transgenes nicht-humanes Säugetier, welches mindestens ein Fusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure, die für das genannte Fusionsprotein kodiert, mindestens einen Vektor, der mindestens eine genannte Nukleinsäure enthält und/oder mindestens eine Zelle, die mindestens eine genannten Vektor enthält, wohei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält,

Bevorzugt enthält das Fusionsprotein des erfindungsgemäßen transgenen nichthumanen Säugetiers einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein murines IgG2b, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4, bevorzugt ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere ein IgG1, besonders bevorzugt kein murines IgG2b.

Tiere zeigen im allgemeinen eine gewebespezifisch erhöhte Expression von Nekteinsäuren und sind daher für die Analyse beispielsweise von Immunreaktionen sehr geeignet. Bevorzugt werden transgene Mäuse verwendet.

dingsgemäßes nicht humanes Säugetier ist beispielsweise eine Maus, eine Ratte ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, eine Ziege, ein Schaf, ein Pferd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein Affe.

Ebenfalls weitere Gegenstände der Erfindung sind die Verwendungen eines Fusiousproteins einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens pine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltendientweder mindestens eine genannte Nukleinsäure oder/und einen genannten Vektor enthaltend mittelestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das 15 Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-AS und ein Fc-Fragment enthält, oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindlingsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans:

zur Inhibierung eines IL-15 vermittelten zellulären Ereignisses, zur Inhibierung der Interaktion eines IL-15 mit seinem Rezeptor und/oder zur Prophylaxe und/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen, insbesondere Transplantationsabstoßungsreaktionen, und/oder Autoimmunerkrankungen.

Ein weiteren Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Fusionsproteins, einer Nuklelnsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Vektors enthaltend miridestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einen genannten Vektor, wobei das Pusionsprotein ein Wildtyp-III-115 und ein Fc-Fragment enthält, zur Lyse von Zellen, die einen IL-15-Rezeptor exprimieren.

30

25

20

.;

5

15

Bevorzugt eathält das Fusions motein der erfindungsgemäßen Verwendungen einerseits ein Wildtyp-IL-15 und andererseits ein humanes oder murines IgG1, ein humanes IgG2, ein murines IgG2a, ein murines IgG2b, ein humanes oder murines IgG3 oder ein humanes IgG4 bevorzugt ein humanes IgG1 oder ein murines IgG2a, insbesondere ein IgG1 besonders bevorzugt kein murines IgG2b.

Vorzugsweise erfolgen die erfriedungsgemäßen Verwendungen in bzw. bei einem humanen oder tierischen Säugetier. Unter einem humanen Säugetier im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Mensch zu verstehen, unter einem tierischen Säugetier im Sinne der vorliegenden Erfindung ist beispielsweise eine Maus, eine Ratte, ein Meerschweinchen, ein Kaninchen, eine Kuh, eine Ziege, ein Schaf, ein Perd, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder ein Affe zu verstehen.

Weiterhin ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung des er indungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans zur Transplantation in ein humanes oder tierisches Säugetier. Bevorzugt handelt es sich um eine Auto- Allo- oder Xenotransplantation.

- Die Transplantation ist die Übertragung von lebendem Material, z.B. von Zellen, Gewebe oder Organen, von einem Teil des Körpers auf einen anderen (autogene Transplantation) oder von einem Individuum auf ein anderes (allogene, syngene und zenogene Transplantation) (Klein, J. S. (1991) Immunologie, 1. Auflage, VHC Verlagsgesellschaft, Weinteim, S. 483) nach dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren. Bei der Transplantation in einen anderen Organismus wird unterschieden in die
 - Synotiansplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angenören und genetisch völlig oder weitgehend identisch sind,
- Allotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angenören aber immungenetisch different sind und

10

15

20

25

30

- 19 -

Xenoransplantation, bei Spender und Empfänger nicht derselben Spezies angehören und demzufolgenmungenetisch völlig different sind.

Hbenfalls ein Aspekt der Erfürfung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfüngigermäßen Fusionsproteinst das die folgenden Schritte enthält:

a Einblingen mindestens eines erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder mindestens eines erfindungsgemäßen Vektors in eine Zelle, und
be Expression der Nukleinsäure unter geeigneten Bedingungen.

Verfahren zum Binbringen von Nukleinsäuren, Vektoren und Genen, beispielsweise Differenzierungs-Markersenen oder Transfektions-Markergenen, in Zellen
sind dem Fachmann gut bekanzt und umfassen die nach dem Stand der Technik
utflichen Verfahren, beispiels weise Elektroporation, Injektion, Transfektion
und/oder Fransformation. Diese Verfahren sind insbesondere bevorzugt, wenn es
sich bei der Substanz um nackte Nukleinsäuren, insbesondere DNA, handelt.

Geeignete Bedingungen für die Expression der Nukleinsäure können beispielsweise durch Expressionsvektoren, beispielsweise durch vorangehend genannte Expressionsvektoren und regulisibare Elemente, beispielsweise Promotoren oder regulative Nukleinsäuresequenzen geschaffen werden. Im allgemeinen enthalten Expressionsvektoren auch für die jeweilige Zelle bzw. das jeweils zu transkribnerende Gen geeignete Expressionen.

Beispiele für regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglieren sind Promotoren, die von der RNA-Polymerase II erkannt werden. Solche Promotoren für die konstitutive Expression in allen Zell- und Gewebetypen sind z.B. der CD11c-Promotor, pGk (Phosphoglyceratkinase)-Promotor, der CMV (Cytomegalievirus)-Promotor, der TK (Thymidinkinase)-Promotor, der EFicx (Elongationsfaktor-1-alpha Promotor, der SV40 (Simian Virus)-Promotor, der RSV (Reus Sarcoma Virus)-Bramotor und der pUB (Ubiquitin)-Promotor.

ĺ

Beispiele für regulierbare Elemente, die zell- bzw. gewebespezifische Expression in Entervenien ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren beier Enhancern von stichen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Derartige Promotoren der sind beispielsweise der Insulin-Prometor für Beta-Zellen des Pankreas, der Sox-2-Prometor für Nervenzellen, der Albuminpromotor für Leberzellen, der Myosin-Schwere-Kette-Promotor für Neskelzellen, der VE-Cadherin-Promotor für Endotthelzellen und der Keratinprometor für Epithelzellen.

- Weitere Beispiele für reguliering Elemente, die eine regulierbare Expression in Eukaryonich ermöglichen, sing RU486 induzierbare Promotoren und der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al., (1994) Curr. Opin. Biotecanol. 5, 516-20).
- Ebenfalls kann die Expression her regulative Nukleotidsequenzen, die Expression mengenmäßig und/oder zerfabhängig beeinflussen, gesteuert werden. Hierzu zählen beispielsweise Enhance sequenzen, Leadersequenzen, Polyadenylierungssequenzen IRES-Sequenzen und Introns.
- Ein weiterer Gegenstand der Eindung ist ein in vitro-Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans, welches die folgenden Schritte erhält:
 - a. Binbringen in mindestens eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder terischen Säugetierorgans zum einen mindestens eine Nukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein und/oder mindestens einen Vektor enthältend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildigsp-IL-15 und ein Erragment enthält, und zum anderen mindestens ein geeignetes Differenzierungs-Harkergen,

25

- 21 -

. Differenzierung der Zelle aus Schritt a.,

10

15

20

25

30

. Selektionieren der differenzetten Zelle aus Schritt b. und

der perisches Säugetierorgan

In eines bevonzugten Ausführe gesform wird in dem vorangehend beschriebenen erfindingsgemäßen Verfahren auch, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeigneten Transfektiges-Markergen eingebracht und nach Schritt a. vorzugsweise die transfektierte Zeit aus Schritt a. selektioniert.

Geeignete Bedingungen für die Differenzierung der Zellen können beispielsweise durch Zugabe von Wachsnum ktoren, welche die gewünschte Zelldifferenzierung ein einen geschaffen weiten.

Dem Fachtrann sind zahlreiche Verfahren zur Selektionierung von Zellen be-

Zur Selektion der differenzieren Zellen von anderen Zellen enthält das erfindingsgemäße Verfahren bevorzet ein positives Selektionsschema. Hierbei wird ein Markergen, beispielsweise Gen, welches eine Antibiotika-Resistenz überträgt, vor, während oder nach dem Differenzierungsschritt in Zelle eingebracht und unter gezigneten Bedingungen zur Expression gebracht. Derartige Bedingungen können beispielsweise darir bestehen, dass die Expression des Markergens um er der Kontrolle eines Promiters steht, der nur in den gewünschten Zellen aktivist.

Durch die Espression des Marke gens wird den erfolgreich differenzierten Zellen eine Resistenzitür das Antibiotik in übertragen. Die der Differenzierung nachfolgende Selektion der Zellen kannt Jaher beispielsweise leicht durch Inkontaktbringen der Zellen mit dem entspreck inden Antibiotikum erfolgen. Zellen, welche die

!!

entspiechende Antibiotika-Resistenz nicht enthalten, sterben ab, so dass lediglich die differenzierten Zellen über ben. Das Inkontaktbringen im Sinne dieser Erfindung kann beispielsweise dur Zugabe der Wirksubstanzen in das Nährmedium einer Zellkultur erfolgen.

5

Unter einem erfindungsgemäß. Antibiotikum wird ein Antibiotikum verstanden, gegen welches das bzw. die as erfindungsgemäße Selektionskassette verwendete(n) Antibiotikum-Resistenzgs (e) eine Resistenz erzeugt/en. Nach Hinzufügen des Antibiotikums zu den kults ierten Stammzellen überleben und differenzieren im wesentlichen nur son se Stammzellen, die den Reporter-Gen-Expressionsvektor enthalten.

10

15

Bevonzugt wird ein zweites Markergen in die Zellen eingebracht, wodurch eine Selektion der Zellen, in denen aus Einbringen der Nukleinsäure und/oder des Vektors gemäß Schritt a. des Verstarens erfolgreich verlief, vorgenommen werden kann. Durch diese doppelte Selektion ist es möglich, eine ca. 90%ig, vorzugsweise ca. 95-100%ig reine Zellpop stion der gewünschten Zellen zu erhalten.

20

Für derartige Selektionierungen können beispielsweise DifferenzierungsMarkergene und Transfektions-tarkergene verwendet werden. Als solche werden
überwiegend Gene verwendet, die eine Resistenz gegen bestimmte toxische Substanzen, beispielsweise Antibiotika, vermitteln, verwendet. Die häufigsten in diesem Zusammenhang verwendet die Antibiotika sind Neomycin, Hygromycin (hph),
Zepcin (Sh ble) und Puromycin (acA).

25

30

Weitere zur Selektionierung gregnete Gene, insbesondere zur Selektion von Stammzellen, sind beispielsweise Gene, die die Expression von Oberflächenmolektilen oder von Fluoreszenzur kern, z.B. GFP, regulieren, mit deren Hilfe die zu selektiererden Zellen über Zest Sortierung aufgereinigt werden können. Weitere Beispiele sind Gene, die für est Enzymaktivität kodieren, die einen Vorläufer einer tox schen Substanz, sog. "Te edrug" in eine toxische Substanz umwandeln. In

10

15

20

25

30

diesem Fall kann eine Negatit Selektion erfolgen, d.h., es überleben nur die Zellen, die den dem Gen vorgeschateten Promotor nicht exprimieren.

Ein anderer Gegenstand der Frindung ist ein Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgerräßen transgener nicht-humanen Säugetieres, welches folgende Schrifte erzhält:

- Einbringen in mindestens the Oocyte, eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisie Zelle eines nicht-humanen Säugetieres einerseits mindestens eine Nukleinzure, kodierend für ein Fusionsprotein und/oder mindestens einen Vektor erhaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein er Wildtyp-IL-15 und ein Fc-Fragment enthält, und anderenseits mindestens ein geeignetes Transfektions-Markergen,
- b. Selektionieren der transfektionen Zelle aus Schritt a.,
- c. Einbringen der nach Schrift b. selektierten Zelle in mindestens eine nichthumane Saugetier-Blastozy
- Einbringen der Blastozyte is Schritt c. in eine nicht-humane, vorzugsweise scheinschwangere, Säugetie Pflegemutter und
- Identifizierung des sich aus genannter Blastozyte entwickelten transgenen nicht-humanen Säugetiers

Die Verfahren zum Einbringen on Blastozyten sind dem Fachmann bekannt. Es kann beispielsweise durch Inje son erfolgen (Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. und Lacy, E., A labs atory Manual (1994), Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Die Identifizierung eines transgeren nicht-humanen Säugetiers kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass genog ische DNA aus dem transgenen nicht-humanen Säugetier extrahiert wird, z.B. aus dem Schwanz einer Maus. In einer nachfolgenden PCR (Pilymerase Chain Restion) werden Primer verwendet, die spezifisch das Transgen für die erfindungs emäße Nukleinsäure erkennen. Eine Integration des Transgens känn auf diese Weste nachgewiesen werden.

10

15

20

١

Eine weitere Möglichkeit der I entifizierung kann mittels Southern Blot erfolgen. Hierbei wird genomische DNA auf eine Membran übertragen und mittels DNA Sonden, beispielsweise radioaktiv markierte DNA-Sonden, die spezifisch für das gesuchte Transgen sind, deteknist.

Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugeners durch Regenerieren iner nicht-humanen Stammzelle, Oocyte, Vorläuferzelle oder immortalisierren zelle zu einem transgenen nicht-humanen Tier, usbesandere von transgenen Mausen sind dem Fachmann aus der DE 196 25 049 und den US 4,736,866; US 5,825,122; US 5,698,765; US 5,583,278 und US 5,750,825 bekannt und umfasse transgene Tiere, die beispielsweise durch direkte njektien von erfindungsgemäßen Expressionsvektoren in Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Expressionsvektoren in embryonale Stammzellen erzeugt werden komen (Polites und Pinkert: DNA Mikroinjection and Transgenic Animal Production, Seite 15-68 in Pinkert, 1994; Transgenic Animal Hechodogy: A Laborator Handbook, Academic Press, San Diego, USA; Houdenine 1997, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands; Doetschmant Gene Transfer in Embryonic Stem Cells, Seite 115-146 in Pinkert, 994, supra Wood: Retrovirus Mediated Gene Transfer, Seite 147-176 in Pinkert, 1994, supra: Monastersky: Gene Transfer Technology: Alternative Techniques and Applications, Seite 177 220 in Pinkert, 1994, supra).

Die Heistellung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers kann auch durch direkte Injektiog einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in den Pronukleus (Vorkein) eines nicht humanen Säugetiers erfolgen.

Zahlreiche Verfahren zur Hersterung von transgenen Tieren, insbesondere von transgenen Mäusen, sind dem Factimann ebenfalls u.a. aus der WO 98/36052, WO 01/32855, DE 196 25 049, US 4,736,866, US 5,625,122, US 5,698,765, US 5,583,278 und US 5,750,825 besannt und umfassen transgene Tiere, die bei-

Caralon, AG

PRODUNT TIT ABL TWI

10

15

20

- 25.

spiels veise über direkte Injektion von erfindungsgemäßen Vektoren in Embryonen oder Spermatozyten oder über die Transfektion von Vektoren oder Nukleinsäuren in embryonale Stammzeilen erzeugt werden können (Polites und Pinkert,
in Pinkert, (1994) Transgenic zumal technology, A Laboratory Handbook, Academic Press London, UK, Seite 15 bis 68; Doetschman, in Pinkert, 1994, supra,
Seite 115 bis 146).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein nach vorangehend beschriebenem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugtes transgenes nicht-humanes Säugetier sowie dessen Nachkommen.

In weiteren Ausführungsformen handelt es sich bei der Stammzelle, welche in dem genannten erfindungsgemäßen in vitro-Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Säugetierorgans und in dem Werfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugebers verwendet wird, um eine pluripotente oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle.

Ein Gegenstand der Erfindung list die Verwendung eines erfindungsgemäßen mansgenen nicht-humanen zur Gewinnung einer Zelle, eines organspezifischen Gewebes und oder eines Säugetierorgans für die Allo- und/oder Xenotransplantation.

Im Fall der Zelltransplantation kann diese beispielsweise mittels eines Implantations-Verfahrens oder mittels eines Katheter-Injektion-Methode durch die Blutgefäßwand erfolgen.

Unter Gewindung im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Entnahme der/des 30 genannen Zelle, Gewebes und/oder Organs aus dem Organismus eines erfindungs bemaßen transgenen nicht humanen Säugetiers zu verstehen. Entsprechende Methoden zur Entnahme sind dem Fachmann allgemein geläufig.

Ebenfalls ein Gegenstand der Effindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen transgenen nicht-humanen Säugetiers, eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines erfindungsgemäßen humanen oder tierischen Saugetierorgans zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wijkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

Hine solche Methode könnte zuru Beispiel darin bestehen. Zellen der vorliegenden lärfinding auf eine 96-well Mikrotiter-Platte auszusäen, dann eine zu untersuchende phannakologisch aktive oder toxische Substanz zuzugeben und anschliedend mittels Zellzahlbestimmung zu analysieren, ob die Substanz einen vermehren Tod der Zellen bewirkt hat.

15

20

25

30

10

Inter den Begriffen pharmakologisch aktiver Wirkstoff und toxische Substanz im Sinne der Erfindung sind all jene Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen und Substanzgemische zu verstehen, die unter geeigneten Bedingungen einen pharmakologischen bzw. Oxischen Einfluss auf einzelne Zellen, einzelne Gewelle, einzelne Organe oder den gesamten Organismus eines tierischen oder humanen Säugetiers austüben Magliche pharmakologisch aktive Wirkstoffe und toxische Substanzen können einfsche chemische (organische oder anorganische) Moleküle oder Verbindungen, Wekleinsäuren oder Analoga von Nukleinsäuren, anti-sense Sequenzen von Nukleinsäuren, Peptide, Broteine oder Komplexe und Antikörper sein. Beispiele sind organische Moleküle, die aus Substanz-Bibliotheken stammen und die auf ihre pharmakologische bzw. toxische Aktivität hin untersucht werden.

Pharmakologisch aktive Wirkstoffe sind beispielsweise Wirkstoffe, die Einfluss

26.

de Teilings-und/oder Überebensfähigkeit von Zellen,

die Sekretion von Proteinen Z.B. Insulin von Beta-Zellen des Pankreas, Do-

pamin von Nervenzellen

die Muskelzellen-Kontraktion und/oder

das Wanderungsverhalten von Zellen.

Anwendung auf den gesamten Organismus eines fierischen oder humanen Säugetiers ist lijerunter ein Einfluss unf beispielsweise

das Henz Kreislaufsystem

das Neuvensystem sowie

die Stoffwechselaktivitäten

zu verstehen.

S

10

15

lijoxische Substanzen sind beisphälsweise Wirkstoffe die

Zellen nach bestimmten Signalen, beispielsweise Stress, zur Apoptose anre-

gen

das Herz-Kreislaufsystem beginflussen.

das Nervensystem beeinfilissen und/oder

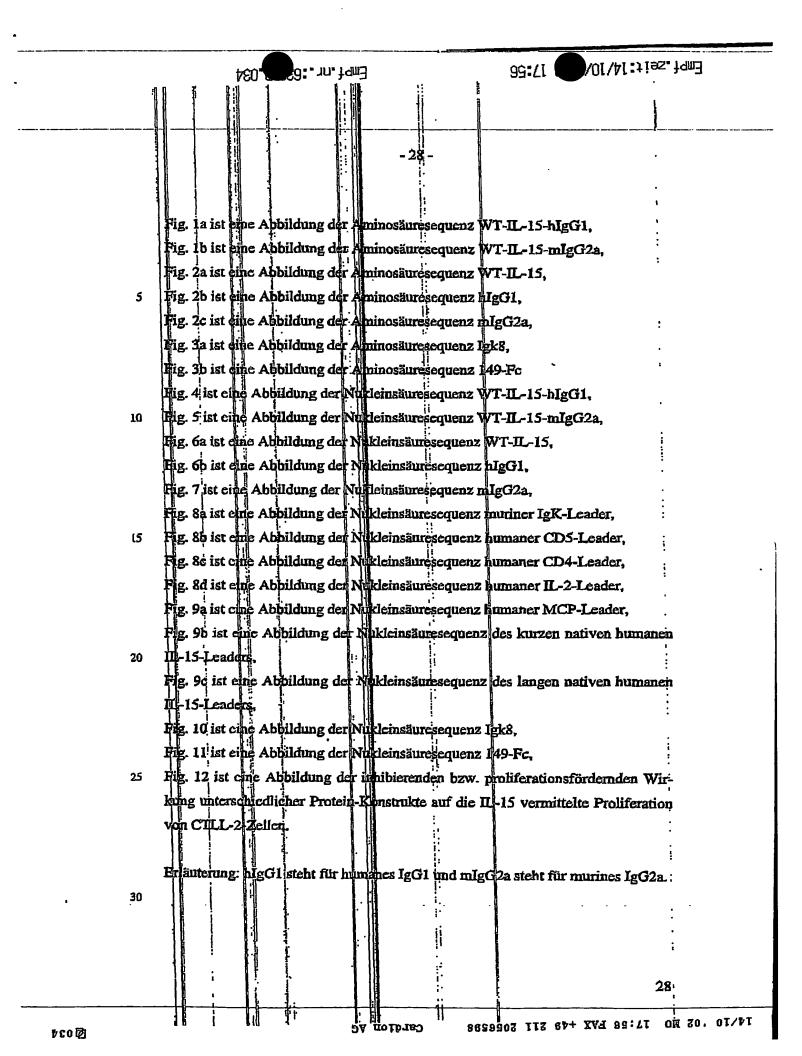
die Stoffwechselaktivitäten beeinflussen.

Die identifizierten pharmakologisch aktiven Wirkstoffe und toxischen Substanzen 20 gegebenenfalls kombingert oder zusammen mit geeigneten Zusatzthid/oder Hilfstoffen zur Herstellung eines Diagnostikums oder eines Arzneimittels zur Diagnose, Prophylare ind/oder Therapie von Transplantationsfolgeerkrankungen und/oder Autoimminerkrankungen, wie vorangehend beispielhaft 25

zufgeführt, verwendet werden

Higuren

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die vorliegende Erfindung verdeutlichen oline sie jedoch zu beschränken.



Empf .nr. 1-355

- 29

Beispiele

Reagenzien

Reagenzien wie Zellkulturmedien, Enzyme, etc. wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei invitrogen (vormals Gibco BRI/Life Technologies), Paisley, UK, bezogen, Laborchemikalien bei Reth (Karlsmihe).

Beispiel 1: Austausch der Signalkequenz

Aus der Arbeitsgruppe von T. Strom (Boston, USA) wurde ein Plasmid erhalten, das im Vektor pSecTagA (Invitrogen, Paisley, UK) die cDNA eines Fusionsproteins aus einem mutlerten humanen IL-15 und einem murinen IgG2a-Fc-Teil (Hinse-C2-C3, Kim et al. 1998) entrielt. Die Fusion von IL-15 mit dem Fc-Teil erfolgte über eine BamHI-Schnittstelle wodurch am Übergang eine zusätzliche Aminosäure (Aspartat) eingefügt wurde.

LS

20

25

10

5

Im II.-15 waren an den Positionen 149 und 156 (entspricht den Positionen 101 und 108 nach Abspalten der Signalsequenz) zwei Gutaminreste zu Aspartat mutiert worden um eine Bindung des Proteins an die alpha-Untereinheit des II.-15 Rezeptors zu ermöglichen, edech die Signaltransduktion über die beta- und gamma-Untereinheit zu verhindem. Vom humanen II.-15 war die native, weuig effiziente Signalsequenz entfernt worden und entsprechend die trunkierte cDNA über die Schmittstellen Hindill und Xhal in den pSecTagA-Vektor kloniert worden, so dass der im Plasmid verliegende Ig-kappa-Leader als Sekretionssignal genutzt werden konnte. Zwischen dem im Plasmid verliegenden Ig-kappa-Leader und dem Beginn der II.15-Sequenz lagen klonierungsbedingt 10 zusätzliche Aminosäuren vor. Um diese zu enternen und im möglicherweise die Sekretion des Proteins zu verbessern, wurde der Ig-kappa-Leader gegen Signalsequenzen verschiedener anderer Proteine ausgebauscht. Dabel kann neben dem ursprünglichen Ig-kappa-Leader bei dem mur die zusätzlichen Aminosäuren entfernt wurden, al-

20

25

160回

-31-

Nhel/BglII-Schnitt entfernt jurg durch eine Oligonukleotidklonierung durch die pben genaunten Signalsequenzen ersetzt.

Beispiel 3: Klonierung des Is-kappa-Leaders

10

15

20

25

Das Fragment lautete wie forgt 5'-Nhel-Leader-IL-15-3' mit einer Bglil Schnittstelle îm 5 - Abschnitt des III-11 . Da dieses Fragment zu lang war, um durch ein einziges Offgonukleotid abgedeikt zu werden, wurden zwei überlappende Oligos und deren komplementäre Strange (insgesamt 4 Oligonukleotide) bei MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen (Sequenz der Oligonukleotide s.u.). Die einzelsträngigen Oligonikleotide wurden sp gewählt, dass bereits überhängende Enden zum klonièren in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen (Nhel, Bglll) vorlagen. Hie Oligoniukleotide wurden zunächst phosphoryliert. Dazu wurden 10 μ g jedes Oligos in einem 20 μ l Ansatz mit 2 μ l 10x Forward-Puffer und 1 μ l T4-Polynukleo didkinase (10 U) für h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden äquimolare Wengen von jeweils Strang- und Gegenstrang-Oligo durch Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur annealt. Vor dem Klonieren in den Vektor wurden die donpelkträngigen Oligonukleotide über Nacht ligiert. Es wurden jeweils 5 al der 5'-und st-doppelstängigen Oligos + 4 al 5x T4-Ligase-Paffer + 5 μl Wasser + 1 μl [74 Ligase (1 U) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anwinde der Ligationsansatz auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und Oligodimere mit Hilfe des Concert Rapid-Gel-Extraction Systems aus dem Gel elniert und im Endvolumen von 40 µl aufgenommen. Die Oligodimere wurden dann in die Konierung eingesetzt: Es wurde über Nacht bei 12°C ligiert (10 41 Oligodimer, μι 5x T4-Ligase-Haffer, 4 μι Wasser, 1 μι Nhel/BglII geschnittenes Plasmid, 1 μ l 74-Ligase (1 U). For einem 20 μ l –Ligationsansatz wurden 5 μ l in die Transformation von E.coll-XII.10-Gold (Stratagene, nach Anleitung des Herstellers) eingesetzt.

30 Sequenzen den Ig-kappa-Oligonuk eotide:

	850. Si. 1n. 14m3	88:51 \\ \(\) \\ \\ \) \\ \\ \\ \]
	5'- Ig-kappa fwd	- 32 -
5	komplementär Ig-kappa rev:	agcagcagiacccatagcaggagtgtgtctgtctccatggtgg
	zweites Forward Oligo 3'-IL-15 fo	
10	komplementär IL-15 rev1.1	
15	5 '- <u>Ctago</u> accategagagaga Ttccaeetecaetegtgagaa	bt sich das folgende Fragment: gill-3´ mit der Sequenz (doppelsträngig) cacactcctgctatgggtactgctgctctggg trgggtgatgtaataataagtgatttgaaaaaaa
20	TGAA÷3 ′ komplementär: 3 ′-GGTGG TACCTGTGTGTG	GAGGAGCATACCCATGACGACGAGACCCAAGG
	TCCAAGGT CACCACTGAAGACC CTAG 5 Erläuterung:	ACTTACATTAACT <u>T</u>
	Leader	n Nehl I bzw. Bgill; fett gedruckt: Ig-kappa- er Minimep (QIAamp DNA Mini Kit, Qlagen)
		hin untersucht. Dazu wurde ein Dreifachverdau 32
860 🖾	57	14/10 '02 MO 17:58 PAX +49 211 2056598 Cardlon

mit Nhel/HsiII (Restriktionsenzyme, die direkt den eingesetzten Leader wieder ausschneiden) und Xbal (schneidet 3' des Fc-Teils) durchgeführt.

Die DNA postiven Klone wurde über den Qiagen Endofree-Maxi-Kit nach den Angaben des Herstellers isdiert und bei GATC (Konstanz) sequenziert. Das so entstandene Plasmid (mutil-15 101/108)-mlgG2a mit bereinigtem Ig-kappa-leader wurde Igks genannt.

Genauso wie für das beschriebene Ig-kappa-Konstrukt wurde auch für die anderen Leader verfahren.

10 Beispiel 4 Herstellung der Konstrukte: WT-Fc und 149-Fc:

15

20

25

Ausgehend vom oben beschriebenen Plasmid Igk8 wurde mittels PCR mit Hilfe eines Forward-Primers mit BgIII-Schnittstelle am 5'-Ende (IL-15fw3.1: 5'-aitgaagatettaticaatetatgc-3') und entsprechender 3'-Reverse-Primer (WT: 5'-ggatecgaagtgttgatgaacatttggaagatattgtacaaaactetgcaaaaattc-3'), (149: 5'- gggatecgaagtgttgatgaacatttgga-3') die Einzelmutanten hergestellt.

Als Template für die PCR-Reaction wurden pro 25 μl-Ansatz 10 ng mutil15(101, 108) murin Pc-Plasmid sowie jeweils 25 pmole Primer, 0,5 μl dNTFs
(Taq-Core-Rec. Qiagen) und 2,5 μl 10x PCR-Puffer, 0,9 U Taq Polymerase (Expand High-Fischity System, Roche, Mannheim) eingesetzt. Die DNA wurde in 30
Zyklen unter den Bedingungen: 45 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 60 Sekunden Annealing bei 60°C und 45 Sekunden Synthese bei 72°C amplifiziert, anschließend über ein Agarose-Gel aufgereinigt, die PCR-Bande aus dem Gel eluient und in 50 μl TE-Puffer aufgenommen. 25 μl des Ansatzes wurden mit 3 μl
10xPuffer 3 und jeweils 15 U BamHI und BgiII versetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde über eine Pharmacia Microspin S400 Säule aufgereinigt. Aus dem Plasmid igks wurde der IL-15-Anteil mit Doppelmutation ehenfalls durch einem Doppeliverdau BgiII/BamHI ausgeschnitten und durch den II-15-Teil mit Einzelmutation oder Wildtypsequenz ersetzt. Die Identität der Plasmide wurde durch Sequenzierung verifiziert.

- 34'-

Beispiel 5: Herstellung von Protein:

10

20

25

30

Durch transferred Transferred von HEK293-Zellen (ATCC, Manassas, USA) wurden die Proteine der Einzelmutanten hergestellt: Dazu wurden pro 150cm² Platte 60 All Lipofectamin 2000 in 2 ml Optimem 1-Medium- und 30 µg Plasmid-DNA (IgK WT Fc, 149-Fc) ebenfalls in 2 ml Optimem 1-Medium verdünnt. Die beiden Lösungen wurden gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließen wurde das DNA/Liposomen-Gemisch auf zu ca. 80% konfluente 150cm2 HEK-293-Platten in Zellkulturmedium (Dulbecco's MEM+Glutamax+ 10%FCS+1% Pen/Strep) gegeben. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel gegen Ultradulture-Medium Biowhittaker, Verviers, Belgien) durchgeführt und anschließend das Zellkulturnedium für 4 Tage auf den Zellen belassen. Der Zellkulturüberstand wurde gesammelt, über einen Falterfilter (Schleicher und Schüll, Dassel) gegeben um die großen Zellbestandteile zu entfernen, dann über einen 2 um-Bottle Top-Filter (Nalgerie-Nunc, Wiesbaden) sterilfiltriert und das IL-15-Fe-Rusionsprofein mittels Aufspinigung über Protein A-Sepharose isoliert. Dazu worden profiliter: Zellkulturiberstand 0,4 ml in Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8.5, 13d mM NaCl) gequolidae Protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia, 50% v/v in Waschpuffer) zugegeben und der Ansatz|bei 4°C über Nacht in einem Überkopfschilttler geschüttell. Die ProteinA-Sepharose wurde in einer leeren Chromatographie-Saule aufgefangen und mit mindestens 150 ml Waschpuffer gewaschen. Has Photein wurde von der Säule mit 0,1 M Glycin pH 2,5 in 1 ml Fraktionen Spiert and sofort mil 60 µl 1M Tris/HCl, pH 9,5 neutralisient. Das Protein wurde gegen PBS-Puffer dialysiert und sterilfiltriert. Im BCA-Assay (Pierce Rodford USA) warde die Konzentration des Proteins bestimmt und gel und Western Blot (Erstantikörper monoklonaler Maus antimittels Silbe human IL-15 BD Biosciences Pharmingen, San Diego USA, Zweitantikörper PCD-Goat and Mais, Dianova, Hamburg) Reinheit und Identität überprüft. An schließend wurde die Funktienalität des Proteins im Proliferationsassay untersucht.

celqton vë

Beispiel 6: Frolife ationsassay:

20

25

CTIII-2 Zellen (ATCC) sind murine cytotoxische T-Zellen, deren Proliferation abhängig von IL 15 oder II. 2, ist und die daher als Indikatoren für die proliferationsinhibierende Wirkung antagonistischer Proteine dienen können. Die Zellen wurden in einem Medium kultiviert, das aus RPMI 640-Medium + 10% hitzeinaktiviertem fötalere Kälberserum (FCS) + 1% Pen/Strep + 20% Rat T-Stim with ConA (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA), einem Gemisch verschiedener Wachstungfalstoren, besteht.

10 Für das Ansetzen eines Proliferationsassays wurden die Zellen von restlichen, für die Kultur der Zellen nötigen Wachstumsfaktoren befreit, indem sie zweimal mit Zellkulturmedium (RPMI 1640+10%FCS+1%Pen/Strep) gewaschen und dann auch in diesem Medium aufgenommen wurden. Dazu wurden die Zellen bei 349g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wieder in Zellkulturmedium aufgenommen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt.

Der Assay riolgie in Flachboden 96 well-Platten und es wurden pro well 150/dl Medium mit 3x10 Zellen/well eingesetzt. Für die Negativkontrolle erhielten die Zellen nur Medium mit 10% FCS, ohne zusätzliche Faktoren. Die Positivkontrolle enthielt zusätzlich rekombinantes humanes IL-15 (R&D Systems, Minneapolis, USA) in einer eine halbmaximale Proliferation der Zellen zulassenden Konzentration (z.B. 125 pg/well). Negativ- und Positivkontrolle wurden jeweils in 6-fach-Ansätzen pineutiert.

Zur Bestimmung der proliferationsinhibierenden Wirkung der oben genannten neuen II-15 Fc Verianten wurden die Zellen wie für die Positivkontrolle beschrieben mit rekombinantem II-15 versetzt und erhielten zusätzlich gereinigtes Protein der Poppelmutante 101/108 ausgehend von Igk8, des Wildtyp-Proteins (WT-Fc) oder der Einzelmutante (149-Fc). Es wurde dabei als höchste Konzentration 2 μ g pro well eingesetzt und weiter jeweils 1:2 Verdünnungen (1 μ g, 0,5 μ g, 0,25 μ g, 0,125 μ g, etc.). Zur Konfrolle wurden in denselben Konzentrationen die

I;

folgenden verwagdten Proteine eingesetzt: als unspezifischer Antikorper wurde mIgG24 (III) Bioliciences Pharmingen, San Diego, USA) eingesetzt, zudem wurde 11.-2-Fc, deseine micht-mutierten Cytokin-Antell enthält und somit die Proliferation der Zellen stemulieren sollte sowie CTLA4-Fc eingesetzt, ebenfalls ein strukfurcil verwähdtes Fusionsprotein, das jedoch die Proliferation nicht beeinflussen sollte Beide letz genannten Profeine wurden bei Chimerigen (Allston, USA) be-Zogen Alle Ansaize wurden in Triplikaten pipettiert

Die Zellen wurden für 44 ± 2 Stunden bei 37°C im CO2-Brutschrank inkubiert und anschließend wurde die Proliferation mit Hilfe des XTT-Cell Proliferation Kits (Roche) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Dazu wurden die beiden Komponenten des Kits im Verhältnis 1:50 gemischt (d.h., 75 ul XTT-Labelling-Reagena + 1,5 µl Electron Coupling Reagenz). Pro well wurden 75 µl der Mischuffg zugegeben und die Platte nach einer Inkubation für 4 Stunden bei 37°C im CO Inkubator im ELISA-Reader bei 490 gegen 690 nm gemessen.

15

10

5

Das Ergebnisist in Figur 23 dargestellt:

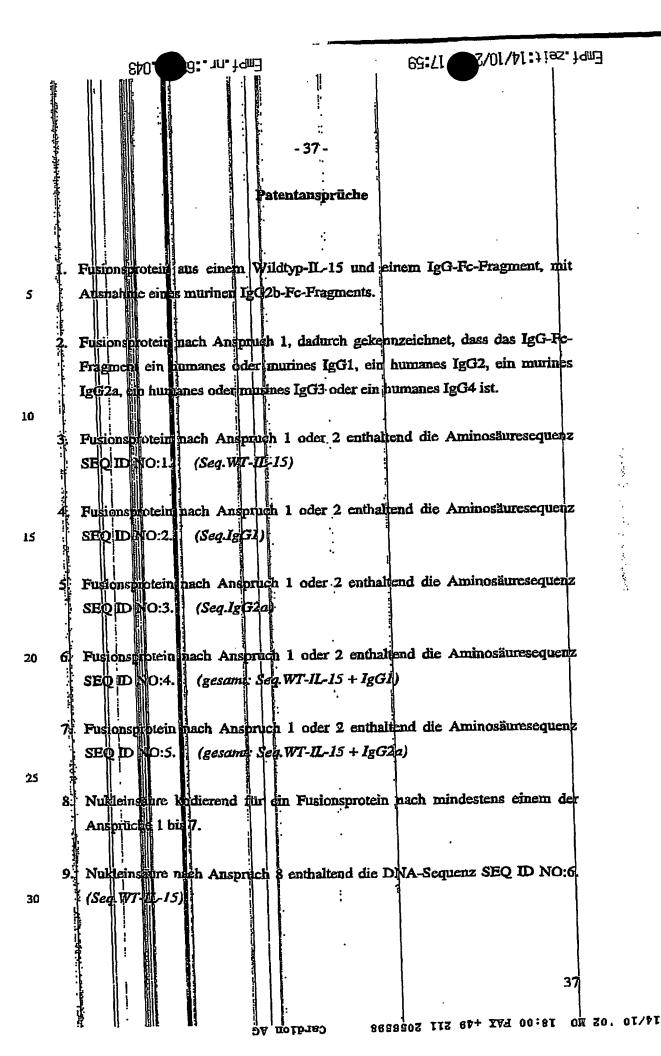
WT-Fc. 149 Fc und Protein der Doppelmutante 101/108 (Plasmid Igk8) zeigen eine inhibiciende Wirkung auf die IL-15 vermittelte Froliferation von CTLL-2 Zellen II-2 le und IgG2a zelgen eine eher proliferationsfördernde Wirkung.

Neg: die Zellen wirden ohne rekombinantes humanes IL-15 kultiviert. 20

Pos: die Zellen erhielten 12,5 pg/well rekombinantes humanes IL-15.

Aile Zellen der weiteren Ansätze erhielten 12,5 pg/well rekombinantes humanes IE-15 das angegezene Protein in den Konzentrationen (von links nach rechts): 2 μ g, 1 μ g, 0.4 μ g, 0,125 μ g, 0,0625 μ g, CTLA4-Fc zeigte keine Wirkung,

alle Werte lagen im Bereich der Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt). 25



		-
	MAC Ed:. in. iam3 00:8[35/01/4[:jisz.iam3	
	- 38 -	
	10. Nukleinsäure nach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:7.	
	11. Nukleinsiure nach Ansgruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO 8.	
S	(Seq.Ig52a)	
	12. Nukleinsäure rach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO 9. (gesame Seq. WT-IL-15 - IgG1)	
10	13. Nukleinsaure sach Anspruch 8 enthaltend die DNA-Sequenz SEQ ID NO:10.	
	(gesamt Seq. VII-15 - IgG2a) 14. Vektor enthaltend mindestens eine Nukleinsäum nach mindestens einem der	
ıs	Ansprüche 8 bis 13.	
	15. Zelle enthalterid mindestens eine Nukleinsäure nach mindestens einem der Ansprüche 8 bis 13 und/oder mindestens einen Vektor nach Anspruch 14.	
	16. Zelle nach Anspruch 15, dedurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zelle	
20	um eine stamutzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle handelt.	
	17. Zelle nach Anstruch 16, dadurch gekennzeichner, dass es sich um eine plum	
25	potente oder miltipotente empryonale, fötale, neonatale oder adulte Stamm- zelle handelt.	
	18. Zelle nach mingestens einem der Ansprüche 15 bis 17 in Form einer Zelllinie	
30	19. Arzneimittel enthaltend mindestens ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche bis 7 mindestens eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 8	
	bis 13, mindestens einen Vektor nach Anspruch 14 und/oder mindestens eine	
	38	
ን ታ ዕ 🗹	ITANO OS HO IS:00 EVY +48 SII SORREBS CELQION VC	1

10

15

20

25

30

Zelle nach einem der Ansprüche 15 bis 17 und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

- 20. Humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder humanes oder tierisches Säugetierorgan enthaltend mindestens ein Fusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens eine Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyr-D-15 und ein Fc-Fragment enthält.
- 21. Transgenes nicht-humanes Säugetier enthaltend mindestens ein Fusionsprotein, mindestens eine Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, mindestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder mindestens eine Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/odermindestens einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wilderp-II-15 und ein Fc-Fragment enthält.
- 22. Verwentung eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Pusionsprotein, eines Vektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsaure und/oder einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 lind ein Fc-Fragment enthält, oder eines humanen oder tierischen ofganspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierungans nach Anspruch 20 zur Inhibierung eines IL-15 vermittelten zellnlärer Ereispisses.
- 22 Verwending eines Fusionsproteins, einer Nukleinsäure kodierend für das genannte Fusionsprotein, eines Wektors enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einer Zelle enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure und/oder einen genannten Vektor, wobei das Fusionsprotein ein

- a. Einbringen mindestens einer Nukleinsäure nich einem der Ausprüche 8 bis 13 unt/oder mindestens eines Vektors nach Anspruch 14 in eine Zelle, und
- b. Expression der Nukleinsähre unter geeigneten Bedingungen.
- 5 29. In vitro Verfahren zur Herstellung eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder numanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 20 enthaltend die folgenden Schritte:
 - a. Fintingen in mindestens eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immorialisierte Zelle eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder humanen oder tierischen Säugetierorgans zum einen mindestens eine Mukleinsäure kodierend für ein Fusionsprotein und/oder nendestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte Nukleinsäure, wobei das Pusionsprotein ein Wildtyp-IL-15 und ein Fernannent enthält, und zum anderen mindestens ein geeignetes Differenzierung Markergen,
 - b. Diffennziering der Zelle aus Schritt a.,
 - c. Selektionieren der differenzierten Zelle aus Schritt b. und
 - d. Einbildigen der selektionleften Zelle aus Schritt c. in ein humanes oder tierisches organspezifisches Gewebe und/oder in ein humanes oder tierisches Sängerierorgan.
 - 30. Verfahren nach Anspruch 29 dadurch gekennzeichnet, dass nach, vor oder gleichzeitig mit Schritt a. mindestens ein geeigneien Transfektions-Markergen eingebracht wird und nach Schritt a. vorzugsweise die transfektierte Zelle aus Schritt a. setektioniert wird.
 - 31. Verfahren nach einem der Anspriiche 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet dass es säh um eine pluripoterie oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder multipotente embryonale, fötale, neonatale oder multipotente

10

15

20

20

- 32. Verfahren zur Erzeugung transgener nicht-humaner Säugetiere nach Anspruch
 21 enthaltend folgende Schrifte:
 - 2. Einbangen in mindestens eine Oocyte, eine Stammzelle, eine Vorläuferzelle und/oder eine immortalisierte Zelle eines nicht-humanen Säugetieres
 einen eits mindestens eine Nukleinsäure, kodierend für ein Fusionsprotein
 und oder rändestens einen Vektor enthaltend mindestens eine genannte
 Nukleinsäure, wobei das Fusionsprotein ein Wildtyp-II-15 und ein FcFragment enthält, und indererseits mindestens ein geeignetes Transfektions-Markengen,
- 10 b. Selectionieren der transfektierten Zelle aus Schritt a.,
 - c. Einbringen der nach Schritt b. selektierten Zelle in mindestens eine nichthumsic Sängetier-Blastozyte,
 - d. Einbüngen der Blastozyte aus Schritt c. in eine nicht-humane Säugetier-Pflegemutter und
- e. Iden azierung des sich aus genannter Blastozyte entwickelten transgenen nicht humanen Säugetiers.
 - 33. Verfahren nach Anspruch 32 dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pluripoterite oder multipoterte embryonale, fötale, neonatale oder adulte Stammzelle handelt.
 - 34. Transgenes nicht-humanes Sängetier, dadurch gekennzeichnet, dass es nach dem Vergahren nach einem der Ansprücke 32 oder 33 erzeugt wurde.
- 25 35. Transgeries nickt-humanes Sängetier, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Nachkomme des Säugetieres nach Anspruch 34 ist.
- 36. Verwending eines transgeren nicht-humanen Säugetiers nach mindestens einem der Anspriche 21, 34 oder 35 zur Gewinnung einer Zelle, eines organspezifischen Gewebes und/oder eines Säugetierorgans für die Allo- und/oder Zenotranspantation.

37. Verweitung eines transgenen nicht-humanen Säugetiers nach einem der Ansprüche 21, 34 oder 35, eines humanen oder tierischen organspezifischen Gewebes und/oder eines humanen oder tierischen Säugetierorgans nach Anspruch 22 zum Auffinden von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen und/oder zur Identifizierung von toxischen Substanzen.

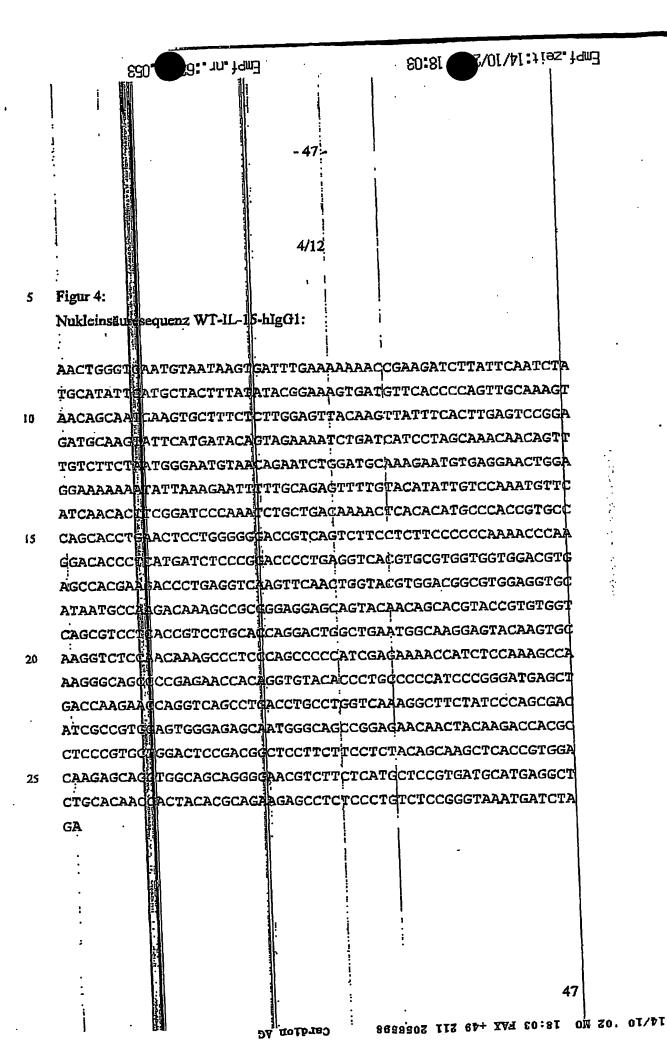
Cardion AG

	090	68. nr. 19m3	S0:81	
		- 44	. i	
			!	
		:	:	
	:		:	
		1/12		
S	Figur 1 a:	NIT II 1611 CI		
	Ammosauresequ	erz WT-IL-15-higG1:		
	NWXNXITSHIKK	TEDY TO CMUTDANT VARA	DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG	
	: I lliki	1	CKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVOMF	
10	. 51:11	P 95	ELFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV	
	· #1.45	L 91. :	Ynstyrvvsvltvlhodwlngkeyke	
	181:101	P M:	LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD	
	: #11111	F 31	Lyskltydksrwqqgnvfscsvmhea	
	DHNHYTQKS SI	3)		
15			:	
			. : []	
	Figur 1 b:			
	Aminosäureseque	enz WT-IL-15-mIgG2a:		
		·		
20	163. N	P 31	VHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG	
	70. W	IB 11.	keceeleeknikeflosfvhivome	
	. (3)(1)	ા મા	FIFPPRIKDVLMISLSPIVTCVVVD	
	. : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	r şi	Ynstlrvvsalpiqhqdwmsgkefk	
	· A!'4	4 7.	LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPE	
25	10:IN	1 11:	Mysklrvekknwvernsyscsvvhe	
	GLHNHHTTEFFS	RIPGK	!	
	7 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		i	
		.		
		1		
			; · · · · · ·	
	;			
			44	

Сагалоп

TSO图

 	S3O. S∶. nr. tam∃	SO:8[\\0[\\l]:jisz.]qm3
	<u> </u>	
	-46	
	1	
	3/12	
5	Figur 3 a:	1
	Aminosäuresequenz Igk8	;
	NWVNVISORKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
10	DASIHDTVENLIJLANNSLSSNGNVTESGCK	:
10	INTSDPREET IKECPPCKCPAPNLLGGPSVF	
	VSEDDPDVOI SWEVNNVEVHTAQIQIHREDYI	ì
	CKVNNKDLEAPIERTISKPKGSVRAPQVYVL DIYVEWTNÜCKTECNYKNTEPYLDSDGSYFM	Į
	GLHNHHTTKEFSRIPGK	ISALKVEKKNWVEKNSISCSVVHE
	GIANTIT (APESATEGA	'
15		i
		. 1
	Figur 3 b:	
	Aminosaurcs quenz 149-Fc	
		:
20	NWVNVISDIKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVI	HPSCKVTAMKCFLLELOVISLESG
	DASIHDTVENLIILANNSLSSNENVTESECKI	•
	INTSDPRGETIKPGPPCKCPARNLLGGPSVF	· 1
	VSEDDPDVQ SWFVNNVEVHTADTQTHREDYN	nstlrvvsalpiqhqdwmsgkefk
	CKVNNKDLE PIERTISKPKGSVRAPQVYVL	1 •
25	DIYVEWTNIGKTEINYKNTEPULDSDGSYFM	: 1
	GLHNHHTTKSFSRTPGK	
		46
		869990Z TIZ 67+ XV4 CO:8T OW ZO. OT/PT



	† 90°			z. 14m3
	! :			
		- 4	8-	
		∦ •		
				•
		5/	2	
5	Figur 5:		1 .	
	Nukleinsäuheseo	uenz WT-IL-15-mlgG2a	1	
			1	
	. ED	M	AAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCT	
10	. 6:1-	LI LI	AAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAG	
10	er er	1)	T†ACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGG ATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGT	
	: Hdl.	M	aicigaicatcotagcaacaacagt Tegatecaaagaatetgaegaacteg	
	i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	II i	AGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTT	
	lil	<u>U1</u>		
15	. 154	111.	ATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGA:	ł
	49十	lik	CCCATAG)'CACATGTGTGGTGGA	1
	· GF	ų į	TCAGCTG&TTTGTGAACAACGTGGAA	1
	·	14	l Agaggattacaacagtactctccggg	}
	19 L	yı.	gactggatgagtggcaaggagttcaai	1
20	: Ki.Ki	}•	ceccatégagagaaccatctcaaaa	1
	CCAAAGGGTCA	GTAAGAGCTC ACAGGT	atatgtc†tgcctccaccagaagaag	.
	gatgactaaga	aacaggtcac†ctgacc	TGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGA1	
	GACATTTAGET	ggagtggaccaaca	ggaaacagagctaaactacaagaaca	
	· tát	51	TTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGT	I.
25	• 2	III	ag¢tactoctgttcagtggtccacgac	
	GGTCTGCACAA	TCACCACACGACTAAGA	gc†tctcccggactccgggtaaatgac	3
	T TOTAL			
		√		
		 :	!	
	Ziniana Ziniana)		
•] .		
			48	3

Figur 6 a:

Nukleinsäur sequenz WT-IL-15:

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTA
TGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGT
AACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTCACTTGAGTCCGGA
GATGCAAG ATTCATGATACAGTTACAGTTACATCATCTAGAGACAACAACAGTT
TGTCTTCTTATGGGAATGTAACAGATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGA
GGAAAAAA TATTAAAGAATTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTC

Pigur 6 b:

15

20

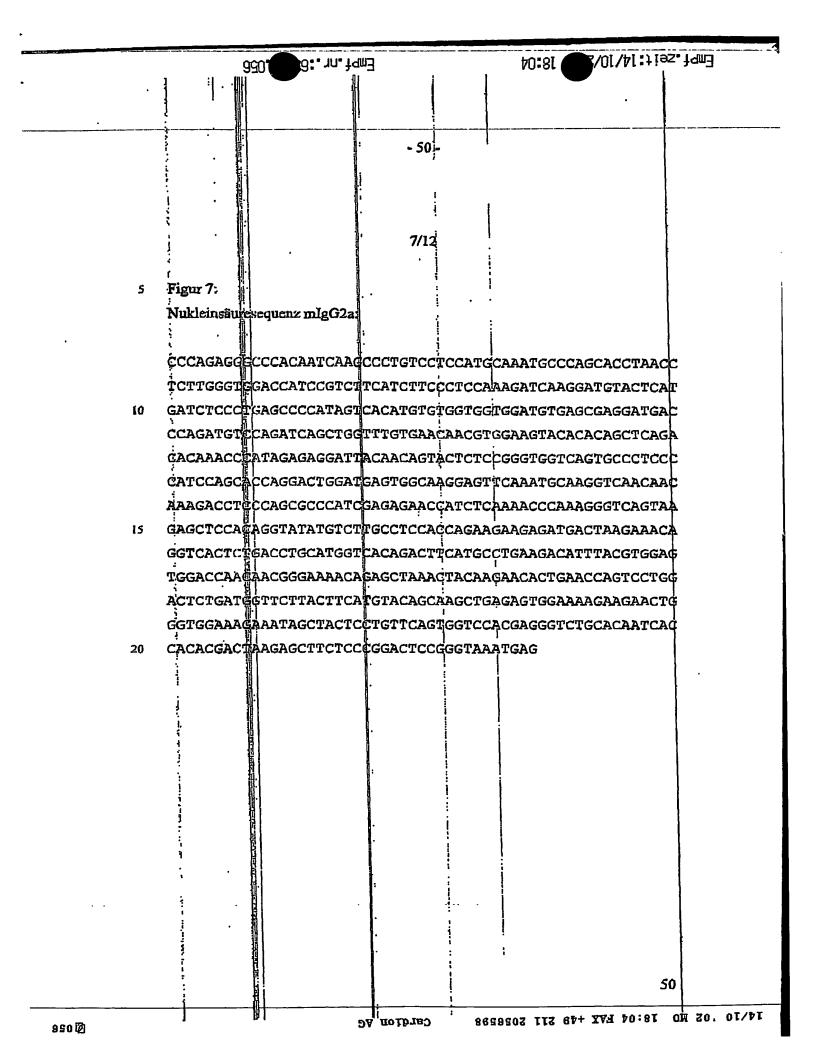
25

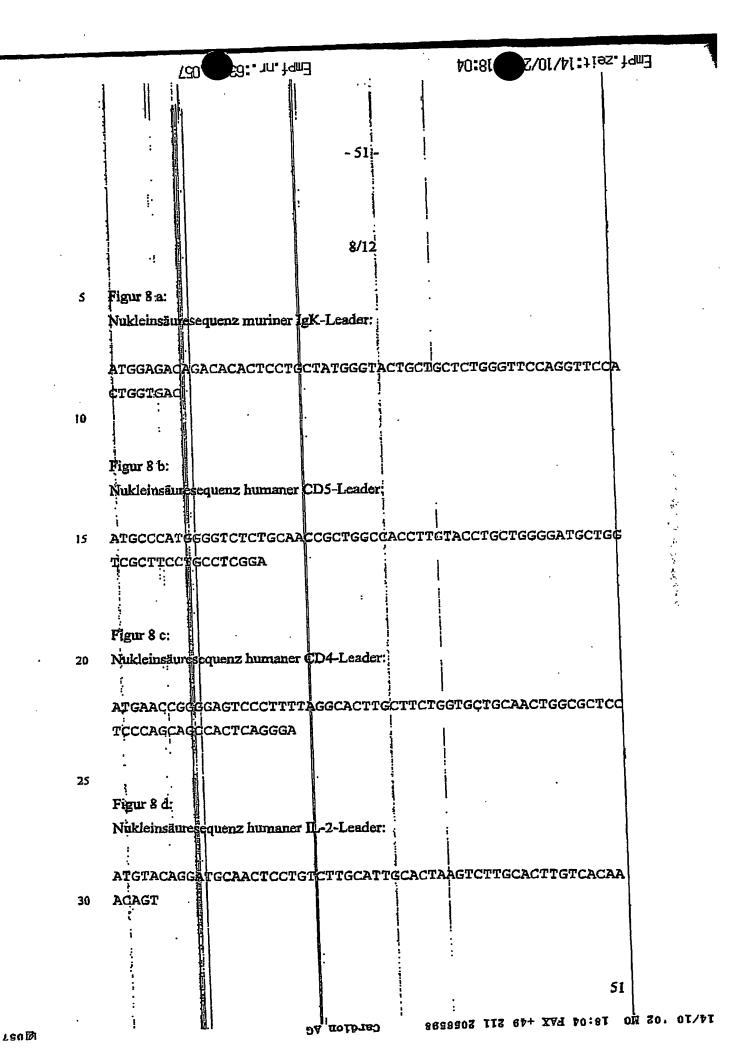
30

ATCAACACTTC

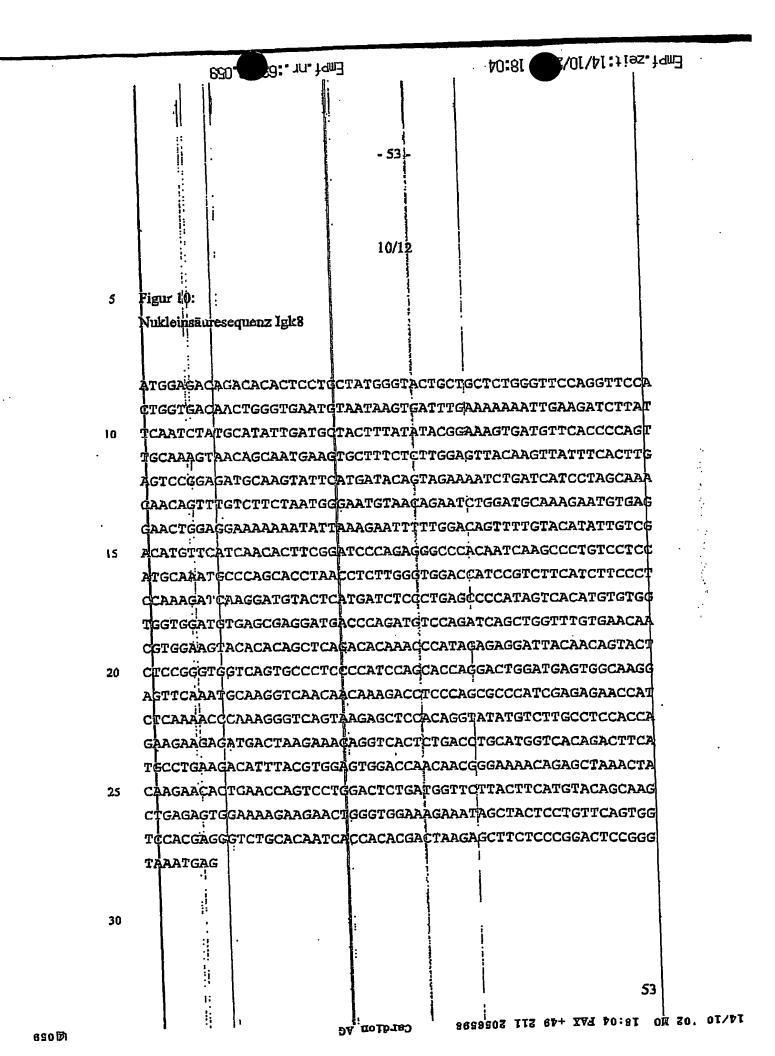
Nukleinsäuresequenz hlgG1:

CCCAAATCTECTGACAAAACTTACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT
CCTGCACCAGGACAGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGACTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCCGGGAACAACTACCAGGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGCCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGGACTG
CCGACGGCTTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTCTCTATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTCCACAACCACTAC
ACGCAGAAGGCCTCTCTCCTGTTTCCGGGTAAATGAT

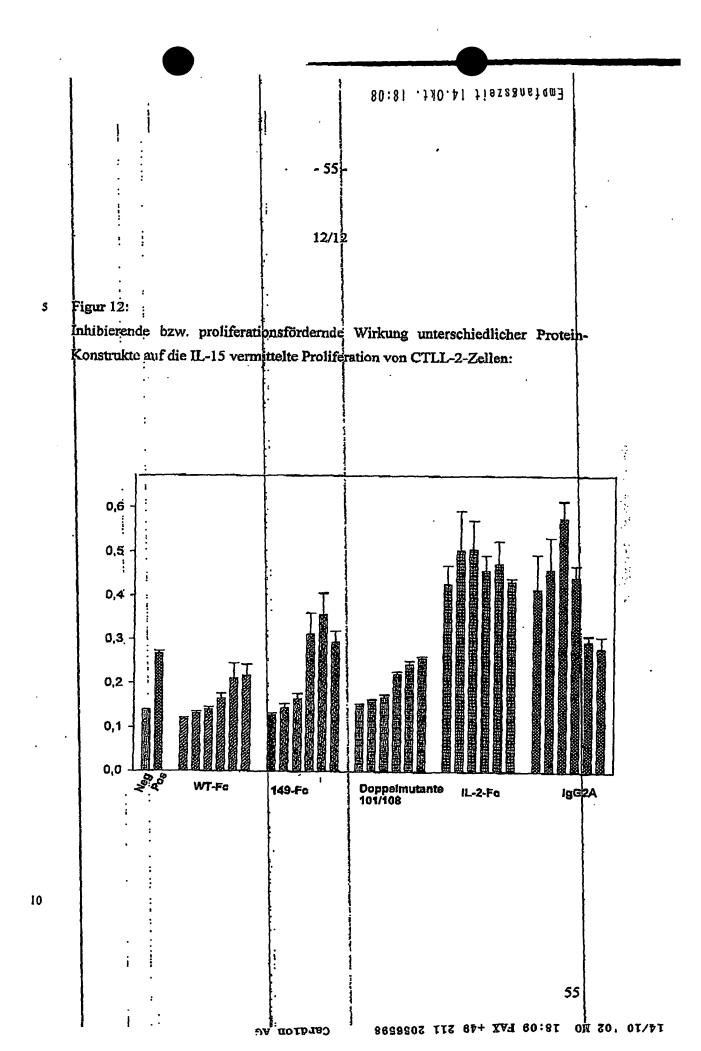




اليوكالشداري مي مي ميشوري المواهدي والمواهدي والمواهدي والمواهدي والمواهدي والمواهدي والمواهدي والمواهدي والمو	820. 8:. m. iam∃	40:8[
	- 52	
	9/12	
5	Figur 9 a: Nukleinsäuresequenz humaner MCP-Leader:	!
		:
	ATGAAAGTCTCTGCCGCCCTTCTGTGCCTGCTC	SCTCATAGCAGCCACCTTCATTC
lo		
	Figur 9 b:	
	Nukleinsäuresequenz des kurzen nativen humane	n II _I -15-Leaders:
15	ATGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCAGTGCAGGGC	TTCCTAA
		·
	Figur 9 c: Nukleinsäuresequenz des langen nativen humane	n IL-15-Leaders:
20	AFGAGAATTTCGAAACCACATTTGAGAAGTATT	TO CANCOA CUCCUA CUTCUCANT
•	TACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTG	GCATTCATGTCTTCATTTTGGG
	CTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAAACAGAAGC	C
25		
	:	
		52
820 🔯	Cardion AG	14/10 .02 NO 18:04 EVX +49 EII 5056598



		;			80:81	A). A essanato	im3
				İ	İ		
	İ	: -		- 54	•	•	
		•		;			
				į	:		
		!					
				11/12			
	E	Figure 111					
	5	Figur 11: Nukleinsäurese	ayanz 140.Fa	1			
		Nucleursaurese	quenz 149-re		i		
		!			:		
		atggagagag	ACACACTCCTĠ	CTATGGGT	CTGCTGCT	CTGGGTTCCAGG	TTCCA
			Ę.	· 1	•	AAAATTGAAGAT	ł
	10	ì		:		GTGATGTTCACCO	1
		• 1	Ì	i. !		'ACAAGTTATTTC?	l l
		1 1		1		CTGATCATCCTAC	
		1				GATGCAAAGAATC	ĭ
		• 1		ß 1		TTTTGTACATAT	i
				ļ :	-	ATCAAGCCCTGT(CCGTCTTCATCT1	i
		1		1		CATAGTCACATGT	
		1 1		1	į	AGCTGGTTTGTG#	i
		1 . 1		K	: ;	AGGATTACAACA	ļ
		1 : 1		1.	i i	CTGGATGAGTGG	j
] '		F	i :	CCCATCGAGAGAI	ŀ
		CTCAAAACCC	Aaagggtcagt.	AAGAGCTCC	ACAGGTAT	ATGTCTTGCCTC	CACCA
		gaagaaga	TGACTAAGAAA	¢aggtcaci	CTGACCTG	CATGGTCACAGAC	TTCA
		Tecctgaaga	CATTTACGTGG	AGTGGACCA	ACAACGGG	Aaaacagagcta <i>i</i>	ACTA
		1 i 1.		Į.	1 .	ACTTCATGTACAC	j
		1 1		Q .	ì .	CTACTCCTGTTCA	
		1	TCTGCACAATC	ACCACACGA	CTAAGAGC	TTCTCCCGGACTC	ceee
		TÄAATGAG			:		
					1		
-							
				į i			
					İ		
				:			54
		1 : 11		ŧ,	1		1



TAO同

	Empfansszent. 18:08
!	
SEQUENÇE LISTING	
<11.0> Cardion AG	
<120> Interleukin-15 Antagonis und/oder Therapie von Transplan	ten und ihre Verwendung zur Prophylaxe tationsfolge- und/oder Autoimmunerkrankungen
<130> ¢36726	
<160> 29	
<170> PatentIn version 3.1	
<2.10> 1	
<271> 346	
<212> ERT	
<213> Artificial	
· <220>	
1	WT-IL-15 and human IgG1
<400> 1	
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp 1 5	Leu Lys Lys Thr Glu Asp Leu Ile 10 15
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr 20	Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His 25 30
Pro Ser Gys Lys Val Thr Ala Met	Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln 45
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp	Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn 65 70	Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
	OCCORD TIT 65+ VWJ RO OT OW ZO. OT/5

	- 1			ì			- []						•		
Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Ĺys	Glu	Çys.	Glu	Glu 90	Lau	Glu	Glu	Lys	Asn 95	Ile
Lys	Glu	Phe	Leu 100	Gln	Ser	Phe		His 105	Ile .	Val	Gln	Mat	Phe 110	Ile	Asn
The	Şer	Asp 115	Pro	Lys	Ser	Ala	Asp 120	Lys	Thr	His	Thr	Cys 125	Pro	Pro	Cys
Pro	Ala 130	Pro	Glu	Leu	Leu	61y 61y	Gly	Pro :	Ser	Val	Phe 140	Leu	Phe	Pro	Pro
Lys 145	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu 150	Met	Ile	Şer	Arg	Thr 155	Pro	Glu	Val	Thr	Cys 160
Val	Val	·Val	Asp	Val 165	Ser	His	Glu	Asp	Pro 170	Glu	Val	Lys	Phe	Asn 175	Trp
Tyr	Val	Asp	Gly 180	Val	Glu	Val	His	Asn 185	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro 190	Arg	Glu
Glu	Gln	Tyr 195		Ser	Thr	Tyr	Arg 200	Val	Val	Ser	Val	Ъец 205	Thr	Val	Leu
His	Gln 210		l'rp	Leu	Asn	Gly 215	Lys	Glu :	Tyr	Lys	Суз 220	Lys	Val	Ser	Asn
Lys 225		Leu	. Pro	Ala	Pro 230	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile 235	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly 240
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro 245		Va1	Tyr	Thr	Lец 250		Pro	Ser	'Arg	Asp 255	Glu
Leu	Thi	: Lys	260		Val	Ser	Leu	7hr 265	Cys	Leu	Val	Lys	Gly 270	Phe	Tyr
Pro	Se)	275		: Ala	Val	. Glu	280		Ser	Asn	Gly	Glr 285	r Pro	Glu	Asn
Asr	туз 290		Thr	Thr	Pro	295		. Leu	Asp	Ser	Asp 300		, Ser	Phe	Phe
Leu 305		r Ser	: Lys	. I.en	Thr 310		. Asp	Lys	Ser	Arg 315		Glr	Gln	Gly	Asn 320
۷a)	Phe	e Ser	Cys	325		. Met	His	Glu	Ala 330		His	Asr	His	335	The

. ALL TO BANAT OM 7A AT/8

20:21	14.011	1 18 Z 2 B n s 1 q m
011.01	+ 413 V L	4 i a wan a a a a a a .

					ن کرد در در در در در در در در در در در در د	أناكنيها بمطبطيه		
						80:81	14.041.	Empfansszei
}			§	1	1			
Gln Lys	Ser Leu 340		ı Şer Pro	Gly 1	Lys			
<210>	2			1				
<211>	347			}				
<212>	PRT].	1			
<213>	Artifici	al						
<220>				: -				
<223>	Fusion p	rotein c	comprisin	g WT-]	[L-15	and murin	lgG2a	
<400>	<u> </u>			ļ. 				
Asn ·Trp 1	·Val Asn	Val Ile 5	Ser Asp		Lys Ly LO	s Thr Glu	Asp Leu 15	Ile
Gln Ser	Met His 20	Ile Asp	Ala Thr	Leu I 25	lyr Th	r Glu Ser	Asp Val	His
Pro Ser	Cys Lys 35	Val Thr	Ala Met 40	Lys C	ys Ph	Leu Lou 45	Glu Leu	Gln
Va) Ile 50	Ser Leu	Glu Ser	Gly Asp 55	Ala S	Ser Ile	His Asp 60	Thr Val	Glu
Asn Leu 65	Tle Ile	Leu Ala 70	Asn Asn	Ser I	eu Sei 75	Ser Asn	Gly Asn	Val 80
Thr Glu	Ser Gly	Cys Lys 85	Glu Cys		ilu Let 10	Glu Glu	Lys Asn 95	Ile
Lys Glu	Phe Leu 100	Gln Ser	Phe Val	His I	le Val	Gln Met	Phe Ile 110	Asn
Thr Ser	Asp Pro	Arg Gly	Pro Thr 120	Ile L	ys Pro	Cys Pro 125	Pro Cys	Lys
Cys Pro 130	Ala Pro	Asn Leu	Leu Gly 135 - ·	GLY P	ro Ser	Val Phe	Ile Phe	Pro
Pro Lys 145	Ile Lys	Asp Val 150	Leu Met	I e Si	er Leu 155	Ser Pro	Ile Val	Thr 160

				1 u												
•						1	1				80:8	li . I	₫° 0К-		Z \$ 9 U I	słqm <u>=</u>
Cys	Val	Val	Val	Asp 165	Val	Ser	G14.	Asp	Asp 170	Pro	Asp	Val	Gln	Ile 175	ser	
Trp	Phe	Val	Asn 180	Asn	Val	Glu		Ніs 185	Thr	Ala	Gln	Thx	Gln 190	Thr	His	
Arg	GJu	Asp 195	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu 200		Val	Val	Ser	Ala 205	Leu	Pro	Ile	
Gln	His 210	Gln	Asp	Trp	Met	ser 215	GJA	Lys	Glu	Phe	Lys 220	Cys	Lys	Val	Asn	
Asn 225	Lys	qaA	Lev	Pro	Ala 230	Pro	Ile	Glu :	Arg	Thr 235	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys 240	
Gly	Ser	Val	Arg	Ala 245	Pro	Gln	Val	Tyr	Val 250	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu 255	Glu	
Ğ].u	Met	Thr	Lys 260		Gln	Val	Thr	i: Leu 265	Thr	Суз	Met	Val	Thr 270	Asp	Phe	
Met	Pro	Glu 275	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu 280	Trp	Thr	Ash	Aşn	Gly 285	Lys	Thr	Glu	
Leu	Asn 290		Lys	Asn	Thr	Glu 295		Val	Leu	Asp	Ser 300		Gly	Ser	Tyr	
Phe 305		Tyr	Ser	r pys	Leu 310	Arg	Val	Glu	ГÀг	Lys 315	Asn	Trp	Val	Glu	Arg 320	
·Asn	Ser	Tyr	Ser	325		Val	Va1	His	G1u 330	Gly	Leu	His	Asn	His 335	His	
Thr	Thr	: Lys	Ser 340		Ser	Arg	Thr	Pro 345	Gly	Lys						
<21	.0>	3						1								
<21	.1>	114														
<21	.2>	PRT														
<2]	.3>	Home.	sap	oiens	:											
<40	0>	3						į.								
Asr 1	Tr	val	. Asn	Val 5	. Ile	Ser	Asp	Lei	Lys 10	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu 15	Ile	

 	 				 		١٠.
	8 (18:	• 1	14.0kf	zsgue	Empt	

	i		Empfanssz 14.0kt. 18:08
Gin Ser Met His	Ile Asp Ala Th	Leu Tyr Thr	Glu Ser Asp Val His
Pro Ser Cys Lys 35	: Val Thr Ala Me 40	Lys Cys Phe	Leu Leu Glu Leu Gln 45
Val Ile Ser Leu 50	Glu Ser Gly As 55	Ala Ser Ile	His Asp Thr Val Glu
Asn Leu Ile Ile 65	Leu Ala Asn As 70	Ser Leu Ser	Ser Asn Gly Asn Val
Thr Glu ser Gly	' Cys Lys Glu Cy 85	s Glu Glu Leu 90	Glu Glu Lys Asn Ile 95
Lys Glu Phe Leu 100		His Ile Val	Gln Met Phe Ile Asn 110
Thr Ser			
<210> 4		;	
<211> 231			
<212> PRT		i i	
<213> Homo sap	piens		
<400> 4			
Pro Lys Ser Ala	Asp Lys Thr Hi	s Thr Cys Pro	Pro Cys Pro Ala Pro 15
Glu Leu Leu Gly 20	Gly Pro Ser Va	l Phe Leu Phe 25	Pro Pro Lys 30
Asp Thr Leu Met	lle Ser Arg Th	t Pro Glu Val	Thr Cys Val Val Val
Asp Val Ser His 50	Glu Asp Pro Gl 55	v Val Lys Phe	Asn Trp Tyr Val Asp 60
Gly Val Glu Val	His Asn Ala Ly	Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Tyr 80
Asn Ser Tör Tyr	Arg Val Val Ser 85	· Val Leu Thr	Val Leu His Gln Asp 95
		- 1	

				ì			Į.								
Trp .	Leu	Asn	100 Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys 105	Lys	Val	Ser	Asŋ	Lys 110	Ala	Leu
Pro	Ala	Pro 115	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile 120		Lys	Alla	Lys	G1y 125	Gln	Pro	Arg
	Pro 130	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu 135	Pro	.Pro	Ser	Arg	Asp 140	Glu	Leu	Thr	Гуs
Asn · 145	Gln	Val	Ser	Lеи	Thr 150	Cys	Leu	:Val	Lys	Gly 155	Phe	l'yr	Pro	Ser	Asp 160
Ile	Ala	Val	Glu	Trp 165	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln 170	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr 175	Lys
Thr	Thr	Pro	Pro 180	Val	Leu	Asp	Ser	Asp 185	СľУ	Ser	Phe	Phe	Leu 190	туr	Ser
Lys	Leu	Thr 195	Val	Asp	ГЛ̀з	Ser	Arg 200	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn 205	Val	Phe	Ser
Суя	Ser 210		Met	His	Glu	Ala 215		His	Asn	His	Tyr 220	Thr	Gln	Lys	Ser
Leu 225	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly 230			\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\							
<21	0>	5						1		MANAGEMENT					
<21	1>	232													
<21	2>	PRT													
<21	3>	mes	musc	ulus											
<40	0>	5													
Pro 1	Arc	, Gly	Pro	Thr 5	· Ile	: Lys	Pro	Cys	Pro 10	Pro	Суз	Lys	Cys	Pro 15	Ala
Pro	Asr	ı Leu	20	ı Gly	Gly	Pro	Ser	va1 25	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro 30	Lys	Ile
Lys	Asp	Val 35	. Leu	Met	Ile	: Ser	Leu 40	ser	Pro	Ile	Val	Thx 45	Cys	Val	Val
Val	Λsp	val	. Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	πle	Ser	Trp	Phe	Val

			1							80:	81 .	1.041	71	rsanstam3
50	•••••••	•			55		•			60				
Asa Asa 65	Val	Glu	Val	H i a 70	Thr	Ala	Gln	Thr	G1n 75	Thr	His	Arg -	Glu	Asp 80
Tyr Asn	Ser	Thr	Lou 85	Arg	Val	Val	·Ser	Ala 90	Leu	Pro	Ile	Gln	His 95	Glή
Asp Trp	Met	Sex 100	G1 y	Lys	Glu	Phe	Lys 105	Cys	Lys	Val	Asn	Asn 110	Lys	Asp
Leu Pro	Ala 115	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr: 1,20		Ser	Lys	Pro	Lys 125	Gly	Ser	Val
Arg Ala 130		Gln	Val	Tyr	Val 135	Leu	Pro	Pro	Рто	Glu 140	Glu	Glu	Met	Thr
Lys Lys 145	Gln	Va1	The	Leu 150	Thr	Cys	Met	Val	Thr 155	Asp	Phe	Met	Pro	Glu 160
Asp Ile	Tyr	Val	Glu 165	Trp	Thr	Asn	Asn :	Gly 170	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn 175	Tyr
Lys Asn	Thr	Glu 180	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 185	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe 190	Met	Tyr
Ser Lys	Leu 195	Arg	Val	Glu	Lys	Lys 200	Asn	Тгр	Vai	Glu	Arg 205	Asn	Ser	Tyr
Ser Cys 210		Val	Val	His	Glu 215	Gly	Leu	His	Asn	His 220	His	Thr	Thr	Lys
Ser Phe 225	ser	Arg	Thr	Pro 230	Gly	Lys			Alban de das militar				•	
<210>	6													
<211>	347						1:		Town to the second					
<212>	PRT								.]					
<213> 2	art a 1	ical	•				1:		1					
	ţ		•				- {:							
<220>		ē								-				
<223> I	ļ 21ģsπ	id												

	ļ															
<400	> 6	5														
Asn 1	Tro	Val	Asn	Val 5	Ile	Ser	Asp	Leu	Lуз 10	lys	Ile	Glu	Asp	Leu 15	Ile	•
Gln	Ser	Met	ніз 20	Ile	Asp	Ala		Leu 25	Tyr	Thr	G1u	Ser	Asp 30	Val	His	•
Pro	Ser	Cys 35	Lys	Val	Thr	Ala	Met 40	Гħг	Cys	Phe	Leu	Leu 45	Glu	Leu	Gln	
Val	11e	Ser	Len	Glu	Ser	Gly 55	Asp	Ala	Ser	Ile	His 60	Asp	Thr	Val	Glu	
Asn 65	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala 70	Asn	Asn	ser	Leu	ser 75	Ser	Asn	Gly	Asn	Val 80	•
Thr	Glu	Ser	Gly	Суя 85	Lys	Glu	Суз	Glu :	G1u 90	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn 95	lle	
Lys	Glu	Phe	Leu 100	Asp	Ser	Phe	Val	His 105	Ile	Vall	Asp	Met	Phe 110	lle	Asn	
Thr	Ser	Asp	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr 120	ile	Lys	Pro	Cys	Pro 125	Pro	Сув	ГЛЗ	
Суз	Pro 130		Pro	Asn	Leu	Leu 135	Gly	Gly	Pro	Sex	Val 140	Phe	Ile	Phe	Pro	
Pro 145		Ile	Lys	Asp	Va l 150		Met	Ile	Ser	Leu 155	Ser	Pro	Ile	Val	Thr 160	
Cys	Val	, Val	Val	Asp 165	Val	Ser	Glu	Asp	Asp 170	Pro	Asp	Val	Gln	Ile 175	Ser-	
Trp	Ph∈	. Val	Asn 180		Va1	Glu	Val	His 185		Ala	Gln	Thx	Gln 190	Thr	His	
Arg	g Glu	Asp 195	Tyr	- Asrı	Sec	Thr	Leu 200	Arg	/ Val	Val	Sex	Ala 205	Leu	Pro	Ile	
Gln	210 210		Asp	тср	Met	Ser 215		Lys	Glu	Phe	Lys 220		Lys	Val	Asn	
Asn 225		Aer	Leu	Pro	Ala 230		Ile	GX	Arç	Thr 235	Ile	ser	. T Åa	Pro	Lys 240	
Gly	, Ser	. Val	. Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Тут	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	

14/10 .05 NO 18:12 KVF +448 ----

																		يجيد
	<u> </u>										80:	81 ·	.0kt	1 4	72880	E T O M 3		
 -				245	 .			<u>. </u>	250					255	· 			
	Glu Met	: Thr	Ly:# 260	Lys	Gln	Val	Thi	: Leu 265		Cys	Met	Val	Thr 270		Phe Phe			
	Met Pro	Glu 275	ĄsĄ	[le	Tyr	Va1	Glu 280	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly 285		Thr	Glu			
	Leu Asn 290	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu 295	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 300	Asp	Gly	Ser	Tyr			•
	Phe Met	Tyr	Ser	l _' ys	Leu 310	Arg	Val	Glu	Lys	Lys 315	Asn	Trp	Val	Glu	Arg 320			
	Asn Ser	Tyr	Ser	Cys 325	Ser	Val	Val	His	Glu 330		Leu	His	Asn	Н і з 335				
	Thr Thr	Lys	Ser 340	Pha	Ser	Arg	Thr	Pro 345	Gly	Lys								
	<210>							1		-								
		347						1.		*							}	
	_	PRT						i										
	<213>	ł	fiça:	1						***************************************								
	<220>							1:		عنده زميد الهديب المسل								
	<223>	Fusi	iq no	rote	in c	ompr:	isin	g mu	tIL-:	15 a	nd Fo	-Fr	agmei	nt				
	<400>	7						<u>}</u>										
	Asn Trp 1	Val	Asn	Val 5	Ile	5er	Asp	Ieu	Lys 10	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu 15	Ile			
	Gln Ser	Met	His 20	lle	Asp	Ala	Thr	Leu 25	туг	Thr	Glu	Ser	Asp 30	Val	His			
	Pro Ser	Cys 35	Lys	Va.)	Thr	Ala	Met 40	Lys	Суз	Phe	Leu	Leu 45	Glu	Leu	Gln			
	Val ile 50	ser	Leu	Glu	Ser	G1y 55	Asp	Ala	Ser	Ile	His 60	Asp	Thr	Val	Glu	-		
	Asn Leu 65 .	Ile	Ile	Leu	Ala 70	Asn	Asn	Sar	Leu	ser 75	Ser	Asn	Gly	Asn	Val 80			
		- 						∤:-			1					-		

nT/

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Amp Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn 105 Thr Ser Asp Pro Arg Gly Pro Thm: Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys 120 Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro 135 130 Pro Lys | Ile Lys Asp Val Leu Met | Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Amp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser 170 Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile 195 200 Glo His Glo Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn 210 215 Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys 235 225 230 Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu 250 Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe 260 Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu 2175 280 Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr 290 300 Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Giu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg 315 Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His

01 70. 0T/b

80:81	14.041.		88	9 U	1 qm
-------	---------	--	----	-----	------

Thr Thr Lys Ser Fhe Ser Arg Thr. Pro Gly Lys
1
<210> 8
<211> 1047
<212> DNA
<213> Artificel
<220>
<223> Fusion protein comprising WT-IL-15 and human IgG1
<400> 8
aactgggtga atgtaataag tgatttgaad aaaaccgaag atcttattca atctatgcat 60
atigatgota ctttatalac ggaaagtgat gttcacccca gttgcaaagt aacagcaatg 120
aagtgettte tettggagtt acaagttatt teaettgagt eeggagatge aagtatteat 180
gatacagtag assatctgat catcctagca ascascagtt tgtcttctaa tgggaatgta 240
acagaatetg gatgeaanga atgtgaggaa etggaggaaa aaaatattaa agaatttttg 300
cagagttttg tacataligt ccaaatgtto atcaacactt cggatcccaa atctgctgac 360
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactce tggggggacc gtcagtcttc 420
ctcltcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatetecc ggacccctga ggtcacgtge 480
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 540
graggrage ataatgccaa gacaaagccg caggaggagd agtacaacag cacgtaccgt 600
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 660
aaggteteea acaaageest eecageeeec ategagaaaa ceateteeaa ageeaaaggg 720
cageeeegag aaccaeagyt gtacaeeetg ecceeteee gggatgaget gaecaagaac 780
caggreages tgacetgent ggteaaagge ttetatecca gegacatege egtggagtgg 840
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 900
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 960
gtetteteat geteegigat geatgagget etgeacaace actacaegea gaagageete 1020
tccctgtetc cgggtaaatg atctaga 1047
<210> 9

					80101 110		i
		•					
		•	III				}
	<211>	1045	\ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \	1			
	<212>	DNA					
	<213>	Artifical	d distance and the				
			li.				ł
	<220>	i					
	<223>	Fusion protein	comprising	WT-IL-15 an	d murin Igo	2a	
	<400>		1				
		gtga atgtastasg	tgatttgaaa	aasattgaag	atcttattca	atctatgcat	60
	attgat	gcta ctttatatac	ggaaagtgat	gttcacccca	gttgcaeagt	aacagcaatg	120
	aaqtgc	tttc tcttggagtt	acaagttatt,	tcacttgagt	ccggagatgc	aagtattcat	18ф
١	gataca	gtag aaaaketgat	catcctagea;	aacaacagut	tgtcttctaa	tgggaatgta	240
	acagaa	itctg gatguaaaga	atgtgaggaa :	ctggaggaaja	aaaatattaa	agaatttttg	300
	cayagt	: tttg tacatatlgt	ccaaatgttq	atcaacactt	cggateccag	agggcccaca	360
	Į.	: geact gtoclocatg	1.	3			420
	1	: ettce etccaagat	₹.	' 1			480
	1	: ggtgg tggatgtgag	· 1	' }		,	540
	aacytg	: Igaāg tacacacagc	tcagacacaa	acccatagag	aggattacaa	cagtactctc	600
		: ggtça gtgccctccc	1	· .			660
		: ygtca acaacaaaga		;			720
	gggtçe	agtās gagotocaca	ggtatatgtc	ttgcctccac	cagaagaaga	gatgactaag	780
	.	ggtca ctctgacctg). i			840
	1	i caaca acgggaaaac		1 :			900
	gatggt	: :tott acttoatgha	cagcaagctg	agagtggaaa	agaagaactg	ggtggaaaga	960
	aatago	ctact octgttcagt	ggtccacgag	ggtctgcaca	atcaccacac	gactaagagc	1020
	tctcc	ccggà ctccggglaa	atgag	\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\			1045
		:					
	\$210>	10!		i.			
	4211>	341		\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\			
	212>	DNA :		1			
	<213>	Homo sapiens					
	1			1			
	<400>	10 :					
	ı			11	5		

4/10 .05 MO TR:12 KVY

	i		[]				-
	<u>aactggg</u> tga	atglasteag	tgatttgaaa	aaaattgaag	atcttattca	atctatgcat	60
	at.tgatgcta	cttratatac	ggaaagtgat	gttcacccca	gttgcaaagt	aacagcaatg	120
	augtgettte	tottggagtt	acaagttatt	tcacttgagt	ccggagatgc	aagtattcat	180
	gatacagtag	aaantctgat	catcctage	aacaacagtt	tgtcttctaa	tgggaatgta	240
	acagaatctg	gatgcasaga	atgtgaggaa	ctggaggaaa	aaaatattaa	agaatttttg	300
	cagagttttg	tacataltgt	ccaaatgttc	atcaacactt	c		34
	<210> 11						ł
•							
1	<211> 697 <212> DNA						
١.	;					•	ĺ
	<213> Homo	sapiens		:			
	l i						ļ
ι	<400> 1:1 cccazatetg	стдасаннас	tcacacatgo	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	60
	ggaccgtcag	tottockett	cccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccggacc	120
	cetqaggtca	cgtgcglygt	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	180
	tggtacgtgg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaagacaa	ageegeggga	ggagcagtac	240
1	!			1		gctgaatggc	300
	aaggagtaċa	agtgcaaggt	ctccaacaaa	gccctcccag	ccccatcga	gaaaaccatc	360
1	l tocaaag oç a	aagggcagce	ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	atecegggat	420
-	gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgcctggtca	aaggcttcta	teccagegae	480
	atcgccgtgg	agtggqagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	caegecteec	540
ŀ	gtgctggact	ccgacggclc	cttattcctc	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	600
	tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac	660
	acgcagaaga	gootolocat	gtctccgggt	aaatgat			697
				! -		•	}
i	<210> 12:					•	į
	<211> 700						
	212> DNA						
	213> mus	musculus			<u>.</u> .		
	400> 12 ccagagggc	CCACAALCAA	gccctgtcct	: catgcaaat	gcccagcaco	taacctotto	60
	1 :			1.	ŧ	gateteetg	120
	<u> </u>			4			

			Ī
agccccatag tcacatgtgt ggtggtgga	gtgagcgagg atg	acccaga tgtccagat	c 180
anctggtttg tgancuscgt ggaagtaca	acagotoaga cac	aaaccca tagagagga	t 240
tacaacagta ctctccyygt ggtcagtgc	ctocccatce age	accagga ctggatgag	ь зор
ggcaaggagt tcaaatqcaa ggtcaacaa	aaagacctec cag	cgcccat cgagagaac	≃ 36 0
atctcaaaac ccaaaqggtc agtaagagc	ccacaggtat atg	tcttgcc tccaccagae	a 420
gaagagatga ctaagaaaca ggtcactct	acctgcatgg tca	cagactt catgcctgae	a 48¢
gocatttacg tggagtggac caacaacggg	aaaacagagc taa	actaçaa gaacactgaa	a 540
ccagtectgg actctgatgg ttcttactto	atgtacagca agci	tgagagt ggaaaagaaq	g 600
aactgggtgg aaagaaalag ctactcctgt	tcagtggtcc acga	agggtct gcacaatcac	= 66 0
cacacgacta agagettete eeggacteeg	ggtaaatgag		700
<210> 13	·		
<211> 63			
<212> DNA	# · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
<21.3> Mus musculus			
<400> 13			
atggagacàg acacactcct gctatgggta	ctgctgctct gggt	tccagg ttccactggt	60
gae			63
<210> 14			
<211> 72			.
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 14			
atgeceatgg ggtetetgea accgetggee	accttgtacc tgct	ggygat gctggtcgct	60
cctgcctcg ga			72
22.00			
<210> 15	1		
^{\$211>} 75 ₁			
4212> DNA			
213> Homo sapiens			1

	80:81 .140.4 B3Z	sanstam3 /
<400> 15' atgaaccggg gagtcccttt taggca	otta cttotagtac tacasotage actooto	≎ca 60
; gcagc <mark>ca</mark> ętc a g gga		7 \$
<210> 16		
<211> 60	-	
<212> DNA		
! <2l3> Homo sapiens		
: <400> 1 <mark>:</mark> 6		
atgracagga tgcaactuct gtortgo	catt geactaagte ttgeacttgt cacaaaca	igt 60
<210> 17		
<211> 68		
<212> DNA		
: <213> Homo sapiens		
	1	
(400> 17 gamagtoto tgocgoodt otgtgo	tgctcatagc agccaccttc atteccca	ag 60
ggctcgct		68
. !		
<210> 18		
(211> 40		
212> DNA	: -	
213> Homo sapiens		
400> 18]:	
tgtcttcat tttgggctgt ttcagtg	cag ggcttcctaa	40
210> 19		,
211> 144		
212> DNA		
l 213> Homo sapiens		
400> 19		
<u> </u>		

6b

atgagaattt cgasaccaca tttgagaagt atttccatec agtgctactt gtgtttactt ctaaacagtc attttctaac tgaagctgg& attcatgt&t tcattttggg ctgtttcagt 12b 144 guagggette ctasasuaga agec

<210> 20

1108 <211>

<212> DNA

Artificial <213>

<220>

<223> Plasmid

<400> atggagacag acacact.ccu gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60 gachactggg tgaatgtaat aagtgatttg aaaaaaattg aagatcttat tcaatctatg 120 catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca 180 atgaagtgot ttotottgga gttacaagtt atttoacttg agtooggaga tgcaagtatt 240 catgatacag tagaaaatet gateateeta geaaacaaca gtttgtette taatgggaat 300 360 gtaacagaat ctggatgcaa agaatgtgag gaactggagg aaaaaaatat taaagaattt ttgyacagtt ttgtacatat tgtcgacatg ttcatcaaca cttcggatcc cagagggccc 420 480 acaatcaage cetgteetee atgeaaatge eageaceta acetettggg tggaceatee 540 gtatteatet tecetecana gatenaggat gtaeteatga tetecetgag ceceatagte 600 acatgtgtgg tggtggatgt gagcgaggat gacccagatg tccagatcag ctggtttgtg 660 aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca caaacccata gagaggatta caacagtact 720 ctccgggtgg tcagtgccct ccccatccag caccaggact ggatgagtgg caaggagttc 780 aaatgcaagg tcaacaacaa agacctccca gcgcccatcg; agagaaccat ctcaaaaccc 840 asagggtcag taagagctcc acaggtatat gtcttgcctc caccagaaga agagatgact aagaaacagg teactotgae etgeatggte acagaettea tgeetgaaga catttacgtg 900 gagtogacca асаасддона аасададста растасаада асастовасс адтостддас 960 totgatggtt ottacttoat gtacagoaag ctgagagtgg aaaagaagaa ctgggtggaa 1020 agazataget actectgice agtggtecae gagggtetge pacaateacea cacgactaag 1080 agctletece ggaeteeggg taaatgag 1108

80:81	Empfansszeit 14.0kt.	

<211> 1108 <212> DNA <213> Artificial

21

<220>

<210>

<223> Fusion protein comprising mutIL-15 and Fc-Fragment

<400> 21 atggagacag acacacacac gotatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt -6¢ gacasetggg tgaatgtaat aagtgatttg aaaaaaattg aagatettat teaatetatg 120 catattgatg ctacittota tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca 180 atgaagtgct thorothgga gttacaagtt atttcacttg agtooggaga tgcaagtatt 240 calgatackg tagaaaalet gateateeta geaaacaaca gtttgtette taatgggaat 300 gtascagaat ctggotycaa agaatgtgag gaactggagg aasaaaatat taaagaattt 360 ttggacagit ttgtacatat tgtccaaatg ttcatcaaca cttcggatcc cagagggccc 420 acasteaage cetgteefee atgeaaatge|ceageaceta acetettggg tggaceatee 480 gtotteatet teesteemam gatsmaggat gtactsatga tetesetgag coccatagte 540 acatgtgtgg tggtgyatgt gagcgaggat gacccagatg tecagatcag ctggtttgtg 600 ascasegitg asgiscacae ageicagses caseccate gagaggatia caacagtact 660 etccgggtig teagtgccet ceceatecag paceaggact ggatgagtig caaggagtte 720 asalgosagg teasesses agaceteeca gegecesteg agagaaceat eteassacee 780 aaaqggtcag taagagctcc acaggtatat |gtcttgcctc| caccagaaga agagatgact 840 aagaaacagg teactorqae etgeatggte acagaertea tgeetgaaga catttaegtg 900 gagtqgacca acaacggqaa aacagagcta aactacaaga acactgaacc agtcctggac 960 tctgatggtt cttacttcat gtacagcaag ctgagagtgg aaaagaagaa otgggtggaa 1020 aganataget actectyrre agtggtecae gagggtetge acaateacea caegactaag 1080 agetteteee ggaeteeggg taaatgag 1108

<210> 22

<211> 74.

<212> DNA

70 OT /5T

	•	
1		80:81 .140.41 sanstan3
<713>	Artificial	·
<220>		
<223>	Oligonucleotide forward primer	
<400>	22 acca togagacaga cacactcotg ctatoggta	c tgctgctctg ggttccaggt 60
	ggtg acea	7
<210> <211>	23	
<212>		·
	Artificial	
<220>		
<223>	Oligonucleotide reverse primer	
<400> ccagtt	23 gtca ccagtgqaac ctggaaccca gagcagcag	gt acceatagea ggagtgtgtc 60
tgtctc	ccatg gtgg	: 74
<210>	24	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>	Oligonucleotide reverse primer	
42237	Crigoride leverse parmer	
<400>		7.7
gatet	tcaat ttttttcasa tcacttatta cattcac	37
<210>	25	·
<211>	36	
		0 78:72 EVY +48 ZIT ZOROROR
)	- Nabulita tiv us; ver aside A

.4/10 '02 MO 18:15 FAX +48 Z11 20'00'A.

		<u></u>				
)Kf: 18:08). pl tiszans	}d@∃	
<212>	DNA					
<213>	Artificial					
<220>						
<223>	Oligonucleotide forward r	rimer				
<400> ctgggt	25 gaat gtantaagtg atttgaaaaa	aattga			36	
<210>	26					į
<211>	111					
<212>	DNA	j				
<213>	Artificial					
		1.				
<220>						
<223>	construct comprising Nhel	and Ig-kap	pa-Leader a	nd WT-IL-15	and Bg	
					·	
<400> ctagec	26 acca tggagacaga cacacteetg	ctatgggtac	tgctgctctg	ggttccaggt	60	
tecaet	ggtg acaactgggt gaatgtaata	agtgatttga	aaaaaattga	a	111	
<210>	27					
<211>	55					
<212>	DNA					
<213>	Artificial					
<220>	!					
	Olionucleutide reverse pri	imer				
	pt.					
<400> ggatacç	i 27! yaag tgttgatgaa catttggaca	atatgtacaa	aactctgcaa	aattc	55	•
<210>	28					
^^^ fil	. !	Cardion A	\$026598 	5 FAX +49 211	.02 MO 18:13	0T/PT

		1	1.0kt. 18:08	3	
		3			
<211>	29			•	
<212>	DNA				
<213>	Artificial				
	!				į
<220>					
<223>	Olionucleonide reverse	primer			
<400>	28				
399accc	gaa gtgttgatga acatttgga				29
<210>	•				
<211>	(
,	DNA :				į
<213>	rtificial				
<220>	! !				
	lionucleotide forward pr		;	•	.
	i	rimer			
	i 9				- 1 · 1
atiqaaga	to ttattcaatc tatgo			٠	25
			·		
					ł
•					
•					
i					
	¥e.	Cardlon	#8 \$11 \$02 0288	TQ:T2 EVX +	OW ZO. 01/51
		.		,	

T80团

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS
 □ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
 □ FADED TEXT OR DRAWING
 □ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
 □ SKEWED/SLANTED IMAGES
 □ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
 □ GRAY SCALE DOCUMENTS
 □ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

OTHER:

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY